MEMORIAS

DO

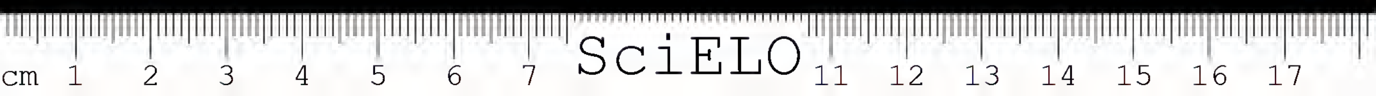
INSTITUTO BUTANTAN

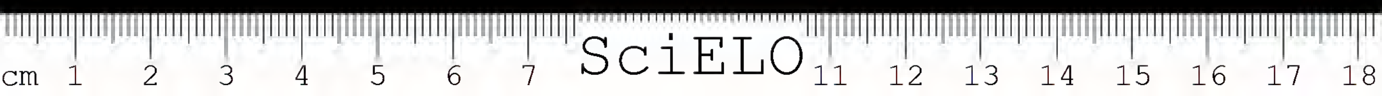
1930

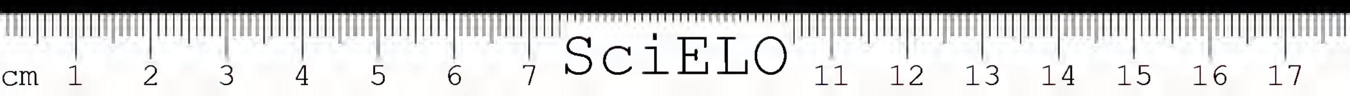
TOMO V



São Paulo, Brasil
Caixa Postal, 65


cm 1 2 3 4 5 6 7
SciELO
11 12 13 14 15 16 17


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17 18


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

MEMORIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

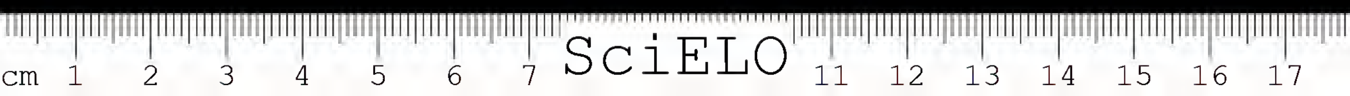
1930

TOMO V



São Paulo, Brasil
Caixa Postal, 65

INDICE


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

DO PREPARO DA LYMPHA VACCINICA

POR

J. LEMOS MONTEIRO E RAUL GODINHO

Capitulo I

Do preparo da lympha vaccinica

E' facto incontestavel que o meio seguro de se evitar a variola consiste na vaccinação, instituida por E. JENNER, como consequencia das suas observações sobre o poder immunizante do *Cow-pox* em relação ao *Small-pox*.

O methodo primitivo desse eminente scientista e bemfeitor da humanidade vem-se aperfeiçoando constantemente com o decorrer dos annos. Hoje é de pratica corrente o emprego da vaccina animal, *cow-pox*, obtida por passagens successivas do virus vaccinico de vitello a vitello, e preparada, para fins prophylacticos, por institutos especializados.

Na qualidade de toda lympha vaccinica deve predominar sempre a mais rigorosa pureza, ao par de uma actividade constante. Producto biologico de indiscutivel importancia social, a vaccina é preparada e empregada sob controle do Estado na maioria dos paizes adiantados, quasi todos obedientes a preceitos codificados por uma sub-commissão especial mantida junto á Commissão de Hygiene da Liga das Nações. Por isto mesmo, ella deve estar sempre presente ás cogitações dos nossos sanitaristas e homens de laboratorio, por merecedora de criterioso estudo que venha estabelecer de vez normas orientadoras para a sua estandardização em nosso meio.

O presente trabalho constitue apenas um pequeno ensaio para o estabelecimento das normas do preparo industrial da lympha vaccinica entre nós, pois estas de certo virão, a seu tempo e com a collaboração de todos os especialistas, uniformizar o processo da producção da vaccina contra a variola nos differentes estabelecimentos officiaes do paiz. Nesta nossa contribuição mostraremos apenas, sem detalhes desnecessarios, a pratica corrente usada no Instituto Butantan para a producção da polpa vaccinica, assim como as technicas de purificação da lympha que vimos empregando desde 1927, quando um de nós foi encarregado da reorganização e da chefia do serviço.



Installações.

O serviço de vaccina animal do Instituto é uma dependencia da sua Secção de Virus e acha-se installada em pavilhões especiaes e adaptados ao seu fim.

Em um pavilhão central acha-se installado o grande laboratorio industrial para o tratamento da polpa, com os differentes apparelhos necessarios para o seu preparo, conservação e acondicionamento. Annexo, encontra-se um laboratorio bacteriologico para as pesquizas e controle das differentes partidas preparadas quanto á sua pureza e actividade do virus.

Em pavilhão ao fundo estão installadas outras dependencias relacionadas com os animaes necessarios: sala com baias para os vitellos em observação; sala com baias para os vitellos vaccinados; sala com balança para pesagem dos animaes; sala para "toilette" dos vitellos (raspagem e preparo); sala para a vaccinação e colheita da polpa, tendo 2 mesas apropriadas á contensão dos animaes e outras installações necessarias (agua esterilizada, etc.); sala com apparelhos de esterilização do material (autoclave, forno Pasteur e apparelho para esterilização da agua); sala-bioterio, para os pequenos animaes vaccinados (coelhos) e os utilizados para as verificações das polpas, e, finalmente, salas para o deposito do material e forragem. Este pavilhão tem um largo corredor central, communicando com as varias dependencias assignaladas.

Esta installação é provisoria, pois os pavilhões foram adaptados ao seu fim actual, estando já organizado um projecto para a installação dos serviços conjunctamente com a Secção de Virus, onde o laboratorio de vaccina animal ficará materialmente melhor apparelhado.

Escolha dos animaes.

Hoje é de pratica corrente o emprego da vaccina animal, *cow-pox*, obtida por passagens successivas do virus vaccinico de vitello a vitello.

Os vitellos destinados á vaccinação são recebidos em lotes de 6 a 12 animaes, escolhendo-se animaes com um peso de 80 a 150 kilos e de apparencia sadia. Uma vez chegados ao Instituto, ficam sob as vistas da secção de medicina veterinaria, onde são submettidos a differentes provas para a confirmação do seu estado hygido, permanecendo em observação durante um certo numero de dias. Entre as provas a que são submettidos, figuram a inoculação da tuberculina, para elucidação da tuberculose, e exames acurados e repetidos quanto á possibilidade da febre aphtosa. Só depois de se obter resultado negativo em todos estes exames é que os vitellos são recolhidos á Secção para serem utilizados.

Primeiros cuidados hygienicos.

Recolhidos á sala destinada aos vitellos em observação, antes de vaccinados, são elles submettidos a um previo e cuidadoso tratamento durante 2 a 3 dias. Em primeiro logar, todo o pello do corpo é cortado com uma machina electrica especial; depois, os vitellos são submettidos a lavagens diarias de todo o corpo, com agua, sabão e escova, sendo-lhes então registados os pesos e as temperaturas.

Os vitellos que tenham, principalmente na região a ser vaccinada, muitos carrapatos, o que se observa commummente nos nossos rebanhos, são submettidos, ainda quando sob as vistas da secção de veterinaria, a banhos carrapaticidas, sendo então necessario augmentar o seu tempo de observação e de lavagens diarias, afim de que desappareçam os traços do antiseptico utilizado e a reacção cutanea por elle determinada.

Raspagem do vitello.

Na tarde da vespera da vaccinação, os vitellos a serem vaccinados, geralmente em numero de 2 ou 3, são levados a uma sala especial onde lhes é raspada toda a região thoraco-abdominal, que depois é convenientemente lavada.

Vaccinação dos vitellos.

Levados para a sala destinada á vaccinação e colheita, os vitellos raspados na vespera são collocados em mesas apropriadas, lavando-se convenientemente a região com agua esterilizada e sabão especial e neutro. Esta lavagem é feita com escova e repetida varias vezes, sendo todo o sabão finalmente removido com agua esterilizada. Depois de enxuto todo o campo com toalhas estereis, procede-se á escarificação da região a ser vaccinada. Usa-se um estilete especial ou um vaccinostylo commum, fazendo-se escarificações lineares, no sentido longitudinal, de cerca de 10 a 15 cm. de comprimento e separadas umas das outras por cerca de 0,5 a 1 cm.

Escarificada toda a região, com toalhas esterilizadas enxuga-se todo o sangue que por ventura tenha surgido das escarificações.

Feito isto, o operador passa, com a mão protegida por luva de borracha, a polpa-semente sobre toda a região. Cerca de 20 a 30 cc. de polpa, conforme o porte do animal, são sufficientes para cada vitello.

Esta technica de vaccinação que adoptámos depois de termos já ensaiado as demais usadas, parece-nos a mais pratica, por sua rapidez e resultados.

Escolha da semente.

Para a vaccinação dos vitellos, a polpa-semente deve possuir certas qualidades principalmente relativas á actividade do virus.

Utilizamos a bovo-vaccina, oriunda de partidas cuja evolução no vitello se mostrou perfeita e normal e que foram separadas e tratadas para esse fim especial. Estas polpas são geralmente addicionadas de 3 partes de seu peso de glycerina e empregadas depois de, pelo menos, 6 mezes de permanencia no frigo a -8.°C. As bovo-vaccinas são usadas desde que tenham soffrido menos de 4 passagens de vitello a vitello.

Além desta, usamos a lapino-vaccina como semente. Para este fim e tambem para a exaltação da actividade do virus e sua purificação indirecta, depois de 3 a 4 passagens em vitello, fazemos uma no coelho.

Os coelhos são vaccinados pelo mesmo processo, fazendo-se, no dorso depilado, as escarificações transversaes. Só são utilizadas como semente as polpas dos animaes em que a evolução vaccinica se apresenta de um modo normal.

Periodo de evolução da vaccina no vitello.

Depois de vaccinados e de retidos na mesa durante uns 15 minutos, os vitellos, protegido o campo vaccinado com pannos esterilizados especiaes, são transportados para as baias da sala a elles destinada.

A temperatura é tomada 2 vezes ao dia, pela manhã e á tarde, sendo mantida uma permanente vigilancia dos animaes, ao par da limpeza e hygiene das baias, cujo ambiente se conserva em meia luz e isento de moscas.

Como alimentação, dá-se, além do farello, capim cortado á machina, evitando-se, assim, sujar o leito da baia.

No 2.º e 4.º dias após a vaccinação, os vitellos são collocados na mesa para exame da evolução das pustulas. Nesses dias, lava-se com agua esterilizada a região vaccinada, e, depois de enxuta, sobre ella passa-se glycerina, com um pincel especial.

Os campos protectores são trocados diariamente e mesmo 2 vezes ao dia, se sujos ou molhados. Importante seria se se pudesse manter de pé, durante os 5 dias de evolução da vaccina, os vitellos. Imaginámos para isto um dispositivo especial que não deu os resultados esperados, em virtude de serem muito baixas as baias já existentes, tendo resolvido reserval-o para ensaio nas nossas futuras installações.

Colheita da polpa.

E' feita geralmente no 5.º dia após a vaccinação. O vitello é collocado na mesa e a região lavada varias vezes com agua esterilizada, sabão e escova. Se a reacção inflammatoria local é muito intensa, após a ultima lavagem applica-se sobre toda a região um soluto de verde brilhante a 1/50.000. Este ahi permanece durante uns 15 minutos e depois é retirado com novas lavagens de agua esterilizada. Se a evolução vaccinica é normal, não se observando edema ou reacção local intensa, dispensamos o uso do verde brilhante.

Uma vez lavado o vitello e enxuto com toalhas esterilizadas, protege-se o campo vaccinado com pannos especiaes esterilizados. Em seguida, o operador, munido de luvas esterilizadas, procede á colheita da polpa, que é recolhida num recipiente especial, esterilizado e previamente tarado.

A colheita é feita com uma cureta de Volkmann, a começar da zona inferior para a superior, evitando que a polpa venha com excesso de sangue. Terminada a colheita, o recipiente contendo a polpa é levado para o laboratorio, e sobre a zona sangrenta do vitello applica-se um pó antiseptico e seccativo, para diminuir o soffrimento do animal.

Necropsia do vitello.

Cada vitello recebe um numero annual de ordem e tambem um numero mensal no casco da mão direita, sendo em seguida enviado para o matadouro municipal, onde o seu dono o faz abater. Acompanhando o animal segue um cartão contendo o seu numero de ordem e o numero no casco da mão direita.

Depois de abatido, o vitello é necropsiado pelos veterinarios do matadouro municipal, que devolvem ao Instituto o resultado da necropsia com a informação sobre se o animal foi considerado bom para o consumo.

Só depois de observadas estas precauções é que a polpa fornecida pelo vitello respectivo poderá ser utilizada.

Pesagem, glycerinização e 1.ª trituração da polpa.

A polpa colhida é immediatamente levada para o laboratorio, onde é pesada. Em seguida é addicionada de glycerina pura neutra (usamos actualmente com bons resultados a glycerina Schering) na proporção de 3 a 4 partes, conforme certas condições e o seu fim posterior.

Com uma espatula especial a polpa é emulsionada na glycerina e soffre uma primeira trituração, grossa, no apparelho de Felix. Esta trituração grossa tem por fim tornar mais intimo o contacto da glycerina com a polpa, que é então recolhida num frasco, convenientemente rotulada (n.º de ordem, data da colheita, quantidade) e levada para o apparelho frigorifico, onde é mantida em temperatura de -8°C. Todas as partidas, registadas em livro e fichas adequadas, são constantemente mantidas nessa temperatura.

Segunda trituração, tamisação e extracção do excesso de ar.

Depois de permanecer no frigo por espaço de tempo superior a 4 mezes (geralmente acima de 6 mezes) a polpa soffre uma 2.ª trituração, fina, no apparelho de Felix, sendo em seguida passada num tamis de malha estreita.

A lympha tamisada é collocada numa proveta e levada para um apparelho de vacuo onde soffre extracção do excesso de ar.

A extracção, por nós instituida, do excesso de ar que augmenta em virtude da tamisação, é de grande vantagem, principalmente para a conservação de uma reacção favoravel ao virus durante a longa permanencia da polpa no frigo.

Retirado o material do apparelho de vacuo, remove-se a espuma da superficie contendo detrictos e pellos que passaram pelo tamis e colloca-se a polpa num frasco, convenientemente rotulado (n.º de ordem, data da 2.ª trituração e tamisação e quantidade em cc.), levando-se novamente para o *frigo*.

Somente depois de um mez pelo menos desta ultima operação é que se iniciam as pesquisas bacteriologicas e a verificação da actividade do virus.

Pesquisas bacteriologicas.

As pesquisas bacteriologicas que se procedem nas differentes partidas preparadas teem por fim a verificação da presença de germes pathogenicos, prin-



cipalmente do bacillo do tetano, nas polpas e a observação do seu grau de contaminação, isto é, se o numero de micro-organismos associados, mesmo não pathogenicos, não ultrapassa o limite de tolerancia.

Para a verificação de anaerobios e principalmente do bacillo tetanico, a polpa é semeada em varios tubos contendo caldo glycosado anaerobio. Os tubos permanecem durante 10 dias na estufa a 37°; se se nota formação de gaz, inocula-se então 1 cc. da cultura em cobaia para a completa eliminação da hypothese da presença daquelle germe.

A contagem de micro-organismos é feita em placas com gelose commum e a verificação da presença de outros germes pathogenicos é dada pela inoculação de 0,5 a 1 cc. da polpa em cobaia de 400 gr. de peso.

Os resultados destas verificações indicarão a marcha a seguir: se a polpa se encontra em condição de ser diluida e distribuida, ou se deverá ser submettida aos processos de purificação, que estudaremos no capitulo seguinte.

Verificação da actividade do virus.

Para a verificação da actividade do virus nas differentes partidas preparadas usamos o coelho, fazendo escarificações em 3 regiões differentes do dorso com a polpa diluida a 1/10, 1/100 e 1/1000. Uma polpa convenientemente activa deve produzir pustulas, ao longo da escarificação, até nesta ultima diluição.

Mais commummente, porém, usamos para esta dosagem o methodo de Gins, da escarificação na cornea da cobaia. Geralmente as polpas que preparamos produzem a ceratite vaccinica typica em diluição ás vezes superior a 1/100.000. Estas polpas poderão ser diluidas com 20 ou mais por cento de agua destillada antes de serem distribuidas. Esta diluição facilita, por outro lado, o enchimento dos tubos capillares.

Segundo o methodo de Gins, a polpa que determina uma ceratite vaccinica na diluição de 1/5000 deve dar na pratica 100 % de resultados positivos em primo-vaccinados.

Todas as partidas preparadas pelo Instituto apresentam, ao sahirem, uma actividade igual ou geralmente superior á considerada favoravel, segundo o methodo de Gins.

Enchimento dos tubos, fechamento e emballagem.

Preenchidas as necessarias condições de pureza bacteriana e de actividade ao Gins positivo em diluição superior a 1 por 10.000, a polpa é diluida com 20 % de agua destillada ou physiologica, podendo ser distribuida nos tubos capillares ou em bisnagas para uso collectivo (100 doses).

A distribuição nos tubos capillares é feita numa caixa de vidro, cujo interior é impregnado de vapores de ether, protegendo-se, assim, a polpa contra as contaminações da poeira do ambiente e da excessiva proximidade do operador.

O processo de enchimento é o utilizado pelo antigo Instituto Vaccinogenico de S. Paulo. Os maços de tubos esterilizados, em numero de 500, abertos em ambas as extremidades, são introduzidos num "bico de mamadeira" de borracha e esterilizado, cuja extremidade fina termina por um tubo de vidro, onde se liga o vacuo. A outra extremidade dos tubos é mergulhada na polpa contida num recipiente esterilizado.

Uma vez cheios os tubos, são suas extremidades fechadas ao maçarico, e, em seguida, acondicionados em blócos de madeira, contendo 10 tubinhos ou 10 doses da vaccina, que são reunidos em enveloppes contendo 5 ou 30 blocos de madeira, respectivamente com 50 ou 300 doses individuaes.

Além deste acondicionamento em tubos capillares, a polpa é tambem distribuida em pequenas bisnagas contendo 100 doses e que são geralmente fornecidas ás autoridades sanitarias para a vaccinação em collectividades (collegios, quarteis, etc.).

Capitulo II

Technicas de purificação usadas no Instituto Butantan

A preoccupação dos experimentadores que se dedicam ao estudo do virus vaccinico e ao preparo da lympha immunizante, orienta-se de preferencia para a obtenção de um producto onde o virus activo appareça em estado de maior pureza, isto é, isento, se possivel, de micro-organismos associados ou pathogenicos, os quaes quasi sempre se reconhecem como responsaveis pelos accidentes sobrevindos ao uso da vaccina animal. Assim é que, á polpa bruta, oriunda da raspagem das pustulas desenvolvidas no vitello vaccinado, se addiciona geralmente uma proporção conveniente de glycerina pura e neutra, collocando-se, em seguida, a mistura em temperatura abaixo de 0° durante varios mezes. Nesta temperatura a acção da glycerina não se mostra prejudicial ao virus, o mesmo não acontecendo com os germes estranhos, por ventura associados, os quaes diminuem de numero com o decorrer do tempo. Infelizmente esta depuração da polpa glycerinada é muitas vezes insufficiente para a obtenção de um producto com a pureza necessaria a uso generalizado como o da vaccina, principalmente em occasiões de emergencia, quando se é obrigado a lançar mão até de polpas recem-colhidas. Diante desta circunstancia foram propostos differentes methodos para a purificação das polpas vaccinicas glycerinadas. Estes se baseam, principalmente, na acção de certos antisepticos volateis ou outras substancias chimicas, que, actuando de differentes maneiras sobre a polpa, agem sobre os germes estranhos, destruindo-os ou diminuindo-lhes o numero, sem manifestar acção nociva, sinão ás vezes muito fraca, sobre o proprio virus.

Processos de purificação das polpas vaccinicas

Sem entrar na discussão de todos os processos estudados e empregados para a purificação das polpas glycerinadas, mencionaremos apenas os que lograram maior repercussão e dos quaes alguns já foram utilizados na pratica.

Em 1895 foi nomeada pelo governo da Prussia uma commissão com o fim especial de estudar os meios de purificação da vaccina; desde então começou a ser bem conhecida a flora da vaccina, graças, principalmente, aos trabalhos de Kirchner, Green, Sacquepée, Hallier, Zurn, Keber, etc., para só citar os mais antigos. Esses investigadores foram os primeiros a orientar os processos de purificação da vaccina para as differenças encontradas na resistencia do virus e dos germes de associação aos agentes chimicos e physicos, o que tornava possivel a eliminação dos elementos estranhos da lympha sem prejuizo da actividade do principio immunizante.

Processos chimicos.

Entre os methodos de purificação por meio de agentes chimicos, foi talvez o do emprego da glycerina um dos primeiros utilizados, a partir de 1886, pelo Real Instituto Vaccinico de Berlim, depois de verificadas as vantagens do seu poder microbicida por Feiler e posteriormente por Kirchner. Essa verificação da acção reductora da glycerina, que se exerce lentamente e durante longo prazo, tem sido confirmada e aproveitada universalmente, ainda em nossos dias, por todos os laboratorios vaccinicos.

Tomarkin e Serebrenikoff procuraram verificar se porventura os effeitos observados com a glycerina tambem seriam produzidos pela vaselina e pela lanolina e concluiram pela insufficiencia do poder germicida destas duas substancias. Outros agentes chimicos tiveram, a seu tempo, applicação experimental visando o mesmo objectivo: o sublimado corrosivo, o iodo, o cyaneto de potassio, o acido acetico, a ammonea, o chloreto de sodio, o alcool e ainda a bile, a saponina e o taurocholato de sodio, todos elles, porém, destruindo concomitantemente o virus vaccinico em maior ou menor espaço de tempo. Entre os agentes purificadores diversas essencias lograram despertar a attenção dos investigadores. A essencia de cravo foi applicada á polpa vaccinica, segundo o methodo de Blaxall, por Degive e Antoine, mas, embora eliminasse todos os germes, prejudicava consideravelmente o virus; a essencia de giroffle foi estudada, entre outros, por M. J. Antoine, D. de Blasi, M. Belin e Marcel, segundo o citado methodo de Blaxall, mas não logrou tambem melhor resultado. Do mesmo modo foram ensaiados a antiformina, o toluol e o quinosol, cuja acção pouco intensa e sem applicação na pratica foi posta em evidencia pelos trabalhos de Fornet, Carini e Seiffert e Hune, respectivamente.

Melhor acceitas e de resultados incontestavelmente evidentes foram as substancias corantes, dentre as quaes se destaca o verde brilhante que, em diluições fracas, agiria sobre os germes associados respeitando o virus, facto que, segundo

as experiencias de Tyler (de Nova York) e de um de nós, se observa quando a polpa assim tratada é mantida em temperatura abaixo de 0°. O seu emprego é, hoje em dia, corrente na America do Norte.

Ainda entre os corantes foram ensaiados o azul de methyleno por Tappeiner e a eosina, bem como o vermelho neutro por Friedberger e Yamamoto.

Na lista das substancias volateis, de mais recente experimentação, encontra-se o ether sulfurico que, em 1913, foi aproveitado em Berlim com satisfactorios resultados, segundo as publicações de Fornet. A mesma technica foi mais tarde repetida por Noguchi e depois por Barbará em Buenos-Aires, não conseguindo este ultimo A. esterilização absoluta da polpa vaccinica, nem mesmo depois de 30 dias de contacto com o ether, além de ter observado sensivel diminuição da actividade do virus, em opposição ao effeito annunciado por Fornet. A conclusões iguaes ás de Barbará chegou Edna Harde, no seu trabalho publicado nos "Annales de l'Institut Pasteur" em Julho de 1916.

Dignas de elevado apreço são as experiencias de Tanner de Abreu, feitas entre nós em 1916, concluindo, por sua vez, que "em relação ao virus vaccinico é evidente, nos resultados de todas as experiencias, a notavel attenuação soffrida por influencia do ether sulfurico".

Preconizada por L. Camus, a chlorethyla não sahiu do dominio experimental. Melhor sorte teve o chloroformio proposto por Green, e usado, sob a forma de vapores durante certo tempo, tambem no nosso antigo Instituto Vaccinogenico.

Ainda em relação aos antisepticos é indispensavel uma menção especial ao phenol, officialmente empregado nos Estados Unidos, por determinação do "Hygienic Laboratory" de Washington, e cuja addição, já feita em outros paizes e experimentada certa vez no Rio de Janeiro com resultado negativo, não se recommenda em nosso meio e clima, visto como as polpas assim tratadas devem ser constantemente mantidas em temperatura abaixo de 0°, mesmo após a sahida do Instituto, para que a actividade do virus não soffra reducção em prazo relativamente curto.

Processos physicos.

Embora em menor numero do que os processos chimicos de purificação da vaccina, não são, todavia, os meios physicos de inferior relevo e importancia, tanto que de longa data vêm sendo tambem ensaiados.

Procurando proteger as pustulas vaccinicas por meio da occlusão, visava Paul, em 1898, a preservação contra os agentes estranhos, embora ao mesmo passo prejudicasse a evolução normal da vaccina.

Santori, em 1904, tentou a pressão de 450 atmospheras sobre o virus vaccinico e verificou tambem os effeitos que a trituração da polpa exercia sobre sua ulterior contaminação. Centrifugação e sedimentação foram processos tentados, na Allemanha ainda, sem resultado apreciavel.



A influencia de differentes especies de raios luminosos tem sido aproveitada fartamente como meio de purificação. De referencia ao frio, nenhuma duvida existe mais para a sua geral acceitação, muito embora a longa permanencia da polpa em baixa temperatura não seja sufficiente para determinar por si só uma baixa sensivel e satisfactoria do teor da sua flora microbiana.

Mais pratico e usado nos Estados Unidos é o processo de purificação da polpa glycerinada por meio do aquecimento descontinuo a 37°, durante 1 ou 2 horas, por alguns dias, até que o numero de germes estranhos fique reduzido a um limite toleravel. Por este processo, ensaiado já com resultados favoraveis por um de nós, favorece-se a acção antiseptica da glycerina sobre os germes de contaminação sem se provocar, com a observancia rigorosa da technica, reducção consideravel da actividade do virus (Figs. A e B).

Processos biologicos.

Em todo caso, quer os processos chimicos de purificação da polpa glycerinada, quer os processos physicos indicados, não representam o ideal que se deve collimar, e que seria a producção facil e fornecimento abundante do virus puro, isto é, isento de quaesquer germes de contaminação. Dahi as tentativas para a cultura do virus *in vitro* e *in vivo*.

A obtenção do virus puro, *in vivo*, é possivel e realizavel pelos processos de Noguchi (vaccina testicular) e de Levaditi (neuro-vaccina). Numerosas são, na verdade, as contribuições ao estudo do virus obtido por inoculação e multiplicação no testiculo de certos animaes, assim como no cerebro de coelhos. Todavia, na pratica, a vaccina testicular, pelas difficuldades technicas do preparo, não teve acceitação generalizada; de seu lado, a neuro-vaccina, apresenta, além deste, outros inconvenientes que a não recommendariam ao uso prophylactico.

Em relação á cultura *in vitro*, citaremos apenas as primitivas tentativas feitas, principalmente por Fornet e os trabalhos relativamente recentes de Carrel e seus collaboradores, do Instituto Rockefeller. Os resultados de Carrel são sobremodo interessantes: este illustre scientista, por meio de uma technica especial, obteve a multiplicação do virus em culturas, *in vitro*, de cellulas embryonarias, acreditando que com um embryão de gallinha se poderá obter cultura pura do virus, em quantidade igual á fornecida por um vitello. Este processo, que representa um grande aperfeiçoamento no preparo da vaccina e no estudo do virus, encerra, como facilmente se comprehende, difficuldades technicas á sua industrialização, pois exige installações especiaes nos laboratorios productores da lympha.

Processos physico-chimicos.

Mais pratico, portanto, seria o aproveitamento do virus obtido segundo o methodo commummente usado, vaccina animal, mas separado, por processos adequados, dos detrictos cellulares e germes estranhos existentes na polpa.

Entre estes processos o mais recommendavel seria o da filtração em velas especiaes, pois que o virus vaccinico é filtravel.

Hugh K. Ward, do Departamento de Bacteriologia e Immunologia, Harvard University Medical School, Boston, obteve a filtração do virus, suspenso em caldo hormonio, através da vela Berkefeld V e, mais recentemente, Hidetake Yaoi e Hisao Kasai, fazendo, preliminarmente, a passagem, através da vela, de uma diluição acida de clara de ovo, de mistura com o virus, conseguiram a filtração deste. Devemos ainda lembrar que estes dois autores japonezes já haviam empregado, na purificação da vaccina, o methodo de adsorpção pelo kaolin.

Sendo o processo, que descrevemos para a obtenção do virus vaccinico puro, baseado na sua filtrabilidade, sob certas condições, através de velas diatomaceas, faremos a seguir algumas considerações a respeito de experiencias realizadas neste Instituto e que constituiram objecto de um trabalho apresentado por um de nós ao V Congresso Brasileiro de Hygiene, reunido recentemente em Recife.

Varios são os factores que influem sobre a passagem do virus vaccinico através dos filtros: natureza e composição da vela, porosidade, carga electrica da vela, do virus e do meio, poder de adsorpção, intensidade da pressão, temperatura, etc.

No decurso de nossas pesquisas, verificamos que, suspenso em caldo glycosado a 1 % (pH=8,0), o virus atravessa com facilidade as velas Mandler (regular) de 6 lbs. de pressão. A filtração do virus se dará tambem, mas com certa difficuldade, se a suspensão for feita em caldo commum e não se dará absolutamente quando em agua physiologica. Os pormenores technicos das experiencias que realizamos e seus resultados constam do trabalho citado.

Estes resultados experimentaes evidenciaram a possibilidade do emprego do virus puro, filtrado, dependendo apenas do estudo de certas particularidades technicas que tornariam possivel o seu aproveitamento industrial para o fim de prophylaxia collectiva.

Mostraremos, a seguir, as experiencias que realizámos, com este fim, indicando primeiramente, em linhas geraes, a technica para a producção da polpa bruta.

Producção e colheita da polpa vaccinica

O vitello é vaccinado com uma semente escolhida e cujo virus se revele sufficientemente activo (Gins positivo em diluição superior a 1/50.000), de accordo com todos os cuidados technicos usuaes, já descriptos no capitulo I.

No 5.º dia depois da vaccinação, estando bem desenvolvidas as pustulas, e não se notando reacção inflammatoria local intensa ou edema, procede-se á colheita da polpa.

A polpa a ser empregada para a filtração, é escolhida entre as pustulas de desenvolvimento mais perfeito e normal e collocada num recipiente especial, esterilizado e previamente tarado.



Retirada a quantidade necessaria para a partida a ser preparada pela filtração, continua-se a colheita da polpa que deverá ser glycerinada e manipulada segundo o methodo habitual para a producção da vaccina animal.

A polpa bruta, separada e contida no recipiente especial, é levada para o laboratorio, onde se iniciam immediatamente os differentes tempos para a obtenção do virus puro, filtrado.

Filtração do virus

Preparo da emulsão.

Colhida a polpa, é ella pesada e suspensa em caldo glycosado a 1 % (pH=8,0) na proporção de 10 grs. para 100 de vehiculo.

A addição do caldo é feita aos poucos e á medida que se tritura num gral.

O emprego do caldo glycosado, na reacção de pH=8,0, mostrou-se o mais adequado, conforme se verifica pelas experiencias do nosso citado trabalho e pelas de Hidetake e Kasai sobre a relação entre a concentração do ionte hydrogenio e a filtrabilidade do virus vaccinico.

A concentração da suspensão da polpa pode ser reduzida de 10 %, pois, conforme veremos adeante, os resultados que obtivemos com o emprego do virus filtrado, nesta proporção, permittem sua maior diluição para emprego na vaccinação. Para se evitar esta nova manipulação do producto, julgamos sufficiente, com as polpas bastante activas, a sua mistura na proporção de 5 grs. para 100 de caldo glycosado.

Centrifugação.

Preparada a suspensão, é ella centrifugada durante certo tempo. As particulas solidas, detrictos cellulares, etc., reunem-se no fundo e o liquido é decantado e collocado em provetas especiaes afim de soffrer a filtração. Verifica-se então a reacção do liquido, a qual, sendo diversa, se trata de reajustar para o mesmo ponto que a do caldo primitivo, isto é, pH=8,0, representando isto uma medida da maxima importancia para que se consiga a filtração com a devida rapidez.

E' desnecessario dizer que todo o material, tubos centrifugadores, provetas, etc. devem ser convenientemente esterilizados.

Filtração e distribuição.

Usamos, como foi descripto nas experiencias do nosso citado trabalho, a vela Mandler (regular) de 6 lbs. de pressão. A vela introduzida na proveta contendo a emulsão é ligada a um apparelho (frasco) que recebe o filtrado, ligado, por sua vez, a um apparelho de vacuo. A filtração é feita com a pressão negativa de 30 a 40 cm. de Hg.

Uma vez terminada a filtração, a distribuição se faz pelo processo usual em taes casos. Distribuido em empolas, o liquido é semeado nos meios habituaes de laboratorio, aerobios e anaerobios, para a verificação de sua esterilidade em relação aos germes estranhos cultivaveis nesses meios.

Capitulo III

Applicação do virus filtrado na pratica

Para o emprego na pratica da vaccinação, era indispensavel verificar as condições em que o virus filtrado se conservaria melhor, o tempo de duração da sua actividade, concentração optima, etc.

Com este fim o virus foi distribuido, em quantidades de 1 ou 2 cc. em tubos longos (como os usados para cultura de leptospira) e esterilizados. Os tubos distribuidos foram separados em differentes lotes, tratando-se cada um, sob varias condições, da seguinte maneira:

I - Os tubos contendo o virus foram submettidos á extracção do excesso de ar por meio do vacuo, sendo immediatamente fechados no maçarico:

1.° lote, conservado na temperatura do laboratorio;
2.° lote, conservado na "frigidaire" a 5°C.;
3.° lote, conservado no "frigo" a -8°C.

II - Os tubos não soffreram a previa extracção do ar e foram apenas, depois da distribuição, fechados ao maçarico.

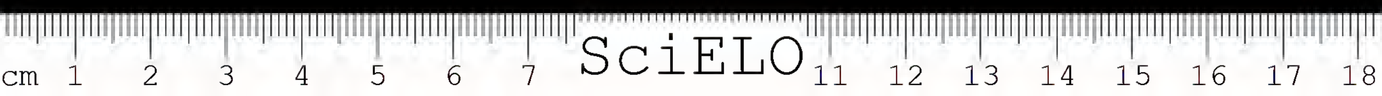
4.° lote, conservado na temperatura do laboratorio;
5.° lote, conservado na "frigidaire" a 5°C.;
6.° lote, conservado no "frigo" a -8°C.

A actividade do virus antes e depois da filtração foi verificada pelos methodos de Gins e Groth, o mesmo acontecendo com o filtrado, mantido nas differentes condições acima assignaladas e no fim de 1, 2 e 6 mezes. Os resultados colhidos quanto á actividade do virus filtrado confirmaram os anteriormente obtidos e assignalados no nosso citado trabalho (Figs. C e D).

Quanto á conservação do virus filtrado, verificámos ser desnecessaria a extracção do excesso de ar, bastando que as empolas distribuidas sejam immediatamente fechadas ao maçarico.

Quanto á temperatura optima para a conservação do filtrado activo, os resultados foram mais favoraveis com os lotes de empolas mantidos em temperatura abaixo de 0°C. Com os lotes conservados na "frigidaire", á temperatura de 5°C., os resultados foram tambem muito favoraveis; o virus manteve sua actividade, mesmo no fim de 6 mezes (tempo maximo até agora verificado), quando conservado a -8°C.

Com os lotes de empolas conservados na temperatura do laboratorio, a verificação feita depois de um mez mostra grande reducção da actividade do virus: Gins positivo apenas até a diluição de 1/100, emquanto que, neste prazo, o virus,



mantido nas condições optimas assignaladas acima, se mostrou activo, por este methodo de dosagem. em diluição superior a 1/5.000.

Pode-se ter a certeza de que o virus puro filtrado, mantido no laboratorio em temperatura abaixo de 0°C. e em temperatura tambem favoravel (5°C.) após sua sahida para os serviços de prophylaxia, poderá ser utilizado com vantagem e efficiencia dentro de um prazo superior a dois mezes.

Emprego do virus puro como semente e na pratica.

Para a verificação da actividade do virus puro, filtrado e dos resultados da sua utilização como semente, servimo-nos de um vitello, vaccinando-o, em uma zona do ventre, com o virus filtrado e, em outra zona, com a suspensão do virus não filtrada. As duas zonas, de cerca de 10 cm^2 cada uma, foram escarificadas, e os virus, na dose de 1 cc., foram esfregados na respectiva zona, estando o operador com luva de borracha.

Em ambas as regiões as pustulas se desenvolveram: com o virus não filtrado (fig. 1), notou-se reacção local mais intensa, ao passo que com o virus filtrado (fig. 2), não se observou reacção inflammatoria e as pustulas, embora menores, se mostraram mais typicas.

Outro vitello foi vaccinado igualmente com o virus filtrado, conservado em condições favoraveis (abaixo de 0°C.) durante 2 mezes. A pustulação mostrou-se bem caracteristica, não se observando reacção inflammatoria (fig 3).

Ainda outro vitello foi vaccinado exclusivamente com o virus puro e filtrado (fig. 4), já para uso industrial da vaccina, com excellente resultado de desenvolvimento das pustulas e rendimento da polpa.

Deante destes resultados experimentaes e da applicação do virus no vitello, tratámos primeiro de verificar a immunidade conferida pelo virus filtrado em relação á lympha commum e vice-versa, em experiencias cruzadas, em coelhos, e vitellos, para em seguida iniciarmos o emprego do nosso virus filtrado, puro, na vaccinação anti-variolica.

Essa immunidade provocada pelo virus filtrado em relação á polpa vaccinica commum ficou bem demonstrada, tanto sob o ponto de vista experimental, por meio das citadas observações em coelhos e vitellos, resumidas nos quadros I (A e B) e II (A e B), como sob o ponto de vista pratico, em resultado da vaccinação de pessoas, tendo igualmente sido verificado que a vaccina commum confere immunidade em relação ao virus filtrado.

Para a applicação pratica, o virus filtrado é distribuido em empolas de 0,5 cc., de modo a se tornar facil sua utilização. Essa quantidade é sufficiente para a vaccinação de, pelo menos 5 pessoas, porquanto as empolas contêm geralmente um excesso de producto.

Antes de se proceder á vaccinação, é aconselhavel fazer-se uma applicação previa de ether sobre a região a ser escarificada e isto para se reduzirem as probabilidades de infecções secundarias. Em seguida se deposita uma pequena

gotta do liquido contido na empola em dois pontos sufficientemente separados (região deltoidiana de preferencia ou outro qualquer ponto que se escolha). Faz-se então a escarificação do tegumento segundo os methodos usuaes, tendo-se sempre o cuidado de evitar o apparecimento de sangue.

Resultados clinicos.

Até agora praticamos com o virus filtrado 53 vaccinações em pessoas, adultos e creanças, residentes em Butantan e proximidades. Os resultados são resumidos no quadro junto.

Quanto á evolução das pustulas, não se observa a reacção local, muitas vezes intensa, como commummente. As pustulas são bem formadas e cercadas por uma ligeira areola pouco avermelhada. As figuras 5 e 6, mostram o aspecto das pustulas vaccinicas desenvolvidas, sendo que em 2 observações se pode ver o aspecto da cicatrização após 3 mezes.

Pelas vaccinações já praticadas, verifica-se um resultado de 100 % de casos positivos em primo-vaccinados; em 19 revaccinados, 7 tiveram a vaccina propriamente dita, 11 tiveram reacção de immunidade e em 1 o resultado é desconhecido.

Para confirmação experimental da immunidade conferida pelo virus vaccinico puro e filtrado, praticamos, como vimos, algum tempo depois, a inoculação da vaccina commum em 5 creanças que haviam sido primo-vaccinadas com o filtrado e em todas ellas observámos reacção de immunidade typica, o mesmo acontecendo tanto no coelho como no vitello anteriormente vaccinados com o virus puro, filtrado.

Devemos assignalar ainda que todos os individuos por este meio vaccinados apresentam um processo especial de cicatriz das pustulas, que não deixa senão uma imperceptivel mancha com tendencia franca ao completo apagamento (Figs. 7 e 8).

Resta-nos, agora, verificar a duração da immunidade conferida pelo emprego do virus filtrado; isto será feito mediante repetição da prova, annualmente, em todas as pessoas por nós ha pouco immunizadas.

RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho são assignalados em conjuncto:

a) o processo de preparo industrial da vaccina animal;
b) os methodos de purificação da lympha vaccinica.

Sobre estes pontos são descriptas, de preferencia, as technicas empregadas no serviço de vaccina animal da Secção de Virus do Instituto Butantan e, como contribuição original, o methodo empregado para a obtenção do virus vaccinico

puro por meio da filtração, assim como o resultado do seu emprego na prophylaxia da variola, chegando ás seguintes conclusões:

1. - E' possivel obter-se, por meio da filtração sob certas condições, o virus vaccinico em estado de pureza e em quantidades apreciaveis;

2. - Esse virus assim obtido é passivel de applicação, com real vantagem, na prophylaxia da variola;

3. - E' evidente a immunidade que elle determina, nas creanças vaccinadas, em relação a uma posterior vaccinação com a polpa vaccinica commum, o mesmo acontecendo sob o ponto de vista experimental com a vaccinação de coelhos, cobaias e vitellos;

4. - A cicatriz consequente á vaccinação com o virus puro, filtrado, é pouco perceptivel, não deprimida e não deformante da esthetica da região.

ABSTRACT AND CONCLUSIONS

This paper deals with *a)* the process of industrial production of the small-pox vaccine; *b)* the methods of purification of the vaccine lymph. In this regard the various technics used at the Instituto Butantan are described together with the purification of the vaccine virus by means of filtration, the conclusions reached at by the authors as to the practical application of the purified virus in the prevention of small-pox being the following:

1. It is possible to obtain, by means of filtration under proper conditions, the vaccine virus entirely pure and in fairly large amounts;

2. The virus thus obtained may be applied to the prevention of small-pox with a decided advantage over the common vaccine;

3. The immunity brought about in children by the purified virus may be demonstrated by the negative "take" of a further application of the common vaccine. This may also be experimentally observed in rabbits, guinea-pigs and calves;

4. The scar resulting from the application of the filtered virus is leveled, undefacing and hardly perceptible.

Observações experimentaes sobre o valor immunizante do virus filtrado em relação á lympha commum e vice-versa

I. Vitellos

A. *Immunização com a vaccina commum e ulterior inoculação do virus filtrado*

N.o	Vaccina usada	Data da vaccinação	RESULTADO	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO
1 (1930)	Polpa n.o 4618	15 - II - 30	Positivo: evolução normal da vaccina; colheita: 20 - II - 30.	Filtrado da polpa n.o 4659	14 - V - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

B. *Immunização com o virus filtrado e ulterior inoculação da vaccina commum*

N.o	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO	Vaccina usada	Data da vaccinação	RESULTADO
17 (1930)	Filtrado da polpa n.o 4653	30 - IV - 30	Positivo: evolução typica e sem reacção inflammatoria; colheita em 5 - IV - 30.	Polpa n.o 4618	14 - V - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

II. Coelhos

A. *Immunização com a vaccina commum e ulterior inoculação do virus filtrado*

N.o	Vaccina usada	Data da vaccinação	RESULTADO	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO
4 (1930)	Polpa n.o 4602	25 - III - 30	Positivo: desenvolvimento normal.	Filtrado da polpa n.o 4653	7 - V - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

B. *Immunização com o virus filtrado e ulterior inoculação da vaccina commum*

N.o	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO	Vaccina usada	Data da vaccinação	RESULTADO
10 (1930)	Filtrado da polpa n.o 4653	14 - IV - 30	Positivo: desenvolvimento typico.	Polpa n.o 4618	19 - IV - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

III. Observações clinicas

A. *Individuos primo-inoculados com o virus puro filtrado e ulteriormente immunizados com a vaccina commum*

Nome	Idade (annos)	Residencia	Inoculação do virus filtrado (data)	Resultado	Emprego da vaccina commum (data)	Resultado
R. K. F.o	3	Butantan	12 - XII - 1929	Positivo	17 - III - 1930	Negativo: R. de immunidade
L. R.	6	,,	,,	,,	,,	,,
J. M. A.	1,6	,,	14 - XII - 1929	,,	,,	,,
J. N.	8	Pinheiros (Escola Butantan)	7 - II - 1930	,,	,,	,,
A. L.	8	,,	,,	,,	,,	,,
A. R.	11	,,	,,	,,	,,	,,

B. *Individuos immunizados com a vaccina commum ha menos de 2 annos e ulteriormente inoculados com o virus puro filtrado*

Nome	Idade (annos)	Residencia	Inoculação do virus filtrado (data)	Resultado
R. K.	35	Butantan	12 - XII - 1929	Negativo: R. de immunidade
A. F.	28	,,	,,	,,
L. P.	40	,,	14 - XII - 1929	,,
M. D. C.	29	,,	,,	,,
J. A.	8	Pinheiros, (Escola Butantan)	12 - II - 1930	,,
P. G.	7	,,	,,	,,

SERVIÇO SANITARIO DE S. PAULO

VARIOLA

Observações de primo- e revaccinados com o virus puro e filtrado

N.º	Data	NOME (iniciaes)	Idade	Primo-vaccinado	Revaccinado	Virus puro filtrado	RESULTADO: Primo-vaccina	RESULTADO: Revaccinação: Vaccina p. dita	RESULTADO: Revaccinação: Vaccinoide	RESULTADO: Revaccinação: Reacção de immunidade	OBSERVAÇÕES
1	1929 12-XII	A. S.	22	Sim		F. I 4624	P				
2	„ „	R. K.	4,6	„		„	„				
3	„ „	R. K.	35		Sim	„		P			
4	„ „	R. K. F.º	3	Sim		„	P				
5	„ „	L. C. C.	45	„		„	„				
6	„ „	L. R.	6	„		„	„				
7	„ „	A. F.	28		Sim	„				P	— Vaccinado ha dois annos com resultado positivo.
8	„ „	M. D. G.	24		„	„		P			
9	„ „	J. G.	2	Sim		„	P				
10	„ „	R. C.	32	„		„	„				
11	„ „	M. D. N.	60	„		„	„				
12	„ „	A. P.	32	„		„	„				
13	„ „	M. G. P.	24	„		„	„				
14	14-XII	M. P. F.	4	„		F. II 4630	„				
15	„ „	L. P.	40		Sim	„					Resultado desconhecido.
16	„ „	A. C.	37	Sim		„	P				
17	„ „	V. S.	3	„		„	„				
18	„ „	E. F.	2,6	„		„	„				
19	„ „	A. F.	30		Sim	„		P			
20	„ „	D. G.	3	Sim		„	P				
21	„ „	S. G.	0,7	„		„	„				
22	„ „	C. A.	0,10	„		„	„				
23	„ „	J. M. A.	1,6	„		„	„				
24	„ „	A. M. M.	33		Sim	„		P			
25	„ „	A. M. M.	3,4	Sim		„	P				
26	„ „	M. D. C.	29		Sim	„		P			
27	1930 7-II	A. R.	11	Sim		„	P				
28	„ „	J. N.	8	„		„	„				
29	„ „	A. R.	11	„		„	„				Mantido o filtrado durante 65 dias no "frigo".
30	„ „	A. L.	8	„		„	„				
31	13-III	B. P.	9		Sim	„				P	
32	„ „	J. M. P.	8		„	„				P	
33	„ „	J. G.	8		„	„				P	
34	„ „	A. R.	8		„	„				P	

Observações de primo- e revaccinados com o virus puro e filtrado

(Continuação)

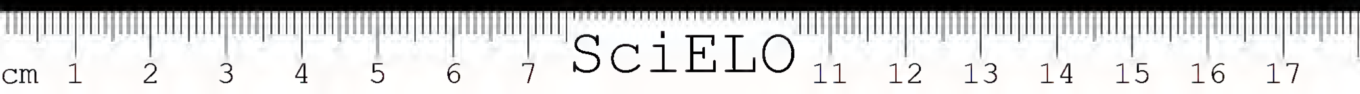
N.º	Data	NOME (Iniciaes)	Idade	Primo-vaccinado	Revac-cinado	Virus puro filtrado	RESULTADO Primo-vaccina	REVACCINAÇÃO Vaccina p. dita	Vacci-noide	Reacção de immunidade	OBSERVAÇÕES
35	13-III	B. P.	7		Sim	F. 11 / 4630				P	
36	10-IV	T. K.	1	Sim		,,	P				
37	22-IX	S. G.	2	,,		,,	P				
38	,, ,,	V. S. V.	1	,,		4659	P				
39	,, ,,	A. F. S.	1	,,		,,	P				
40	,, ,,	M. C.	0,11	,,		,,	P				
41	1-X	O. C. B.	28		Sim	,,				P	
42	,, ,,	R. C. B.	5		,,	,,		P			
43	,, ,,	J. C. B.	6		,,	,,				P	
44	,, ,,	R. C. B.	1,6	Sim		,,	P				
45	,, ,,	B. K.	20		Sim	,,				P	
46	,, ,,	E. R.	24		,,	,,		P			
47	16-X	M. H.	5	Sim		4672	P				
48	29-XI	R. M.	21		Sim	,,				P	
49	12-XI	F. S. S.	4	Sim		,,	P				
50	,, ,,	D. S. S.	3	,,		,,	P				
51	,, ,,	G. S. S.	2	,,		,,	P				
52	,, ,,	A. S. S.	6		Sim	,,				P	
53	13-XII	A. C.	0.3	Sim		,,	P				

Verificação da immunidade conferida pelo virus filtrado em relação á vaccina commum

N.º	Data	NOME (Iniciaes)	Idade	Primo-vaccinado	Revac-cinado	Virus puro filtrado	Primo-vaccina	Vaccina p. dita	Vacci-noide	Reacção de immunidade	OBSERVAÇÕES
1	1930 / 17-III	R. K. F.º	3		Sim	4619				P	Estes resultados confirmam a immunidade conferida pelo virus filtrado e puro.
2	,, ,,	L. R.	6		,,	,,				,,	
3	,, ,,	J. M. A.	1,8		,,	,,				,,	
4	,, ,,	J. N.	8		,,	,,				,,	
5	,, ,,	A. L.	8		,,	,,				,,	
6	,, ,,	A. R.	11		,,	,,				,,	

REFERENCIAS

1. *Barbará, B.* — Revista Inst. Bact. Dep. Nac. Higiene Buenos Aires :306-307.1916.
2. *Belin, M.* — Rev. Int. Vaccine IV(1):40.1913-1914.
3. *Blazall, B.* et *Frank* — Revue Int. Vaccine III(5):373.1913.
4. *Camus, L.* — C. R. Soc. Biol. Paris II:699.1913.
5. *Camus, L.* — Rev. Int. Vaccine IV(1):16.1913-1914.
6. *Camus, L.* — Rev. Int. Vaccine II(4):320.1912.
7. *Camus, L.* — Rev. Int. Vaccine IV(4):294.1913.
8. *Carrel, A.* — J. Exper. Med. XXXVIII:407.1923.
9. *Chaumier* — Rev. Int. Vaccine I(1):28.1910.
10. *Fornet* — Rev. Int. Vaccine IV(1):93.1913.
11. *Friedberger, E.* et *Iamamoto, J.* — Rev. Int. Vaccine IV(5):401.1913-1914.
12. *Godinho, Raul* — Com. V Congresso Bras. de Hygiene Recife, 1929, *in* Arch. Hygiene IV(1):75.1930.
13. *Green* — The Lancet :1738.1903.
14. *Levaditi, M.* et *Nicolau, L.* — C. R. Acad. Sc. Paris CLXXVI(4):1768.1923.
15. *Monteiro, J. Lemos* — Com. Soc. Biol. S. Paulo 1927; Com. V Congresso Bras. de Hygiene, Recife 1929, *in* Arch. Hygiene IV(1):67.1930.
16. *Noguchi, H.* — J. Exper. Med. XXI(6):589.1915.
17. *Reynals, F. D.* — Stud. Rockefeller Inst. Med. Res. LXV:237.1928.
18. *Santori* — Annali Igiene Sperimentale XIV:586.1904.
19. *Sacquepée* — These 1897, cit. *in* These Tanner de Abreu.
20. *Tanner de Abreu* — These 5-27:1916.
21. *Tomarkin* et *Serebrenikoff* — Rev. Int. Vaccine I(6):531.1911.
22. *Yaoi, H.* et *Kasai, H.* — Japan. J. Exper. Med. VII(2):241.1929.
23. *Yaoi, H.* et *Kasai, H.* — Japan. J. Exper. Med. VII(3):389.1929.
24. *Yaoi, H.* et *Kasai, H.* — Japan. J. Exper. Med. VII(2):243.1929.
25. *Voigt, L.* — Rev. Int. Vaccine IV(4):243.1913-1914.
26. *Ward, H. K.* — J. Exper. Med. L(1):31.1929.



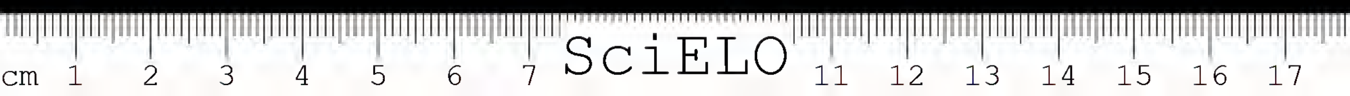

cm 1 2 3 4 5 6 7
SciELO
11 12 13 14 15 16 17

Fig. A.
Vaccina n.º 4578 (não purificada)



Reacção local e erupção confluente dando cicatriz defeituosa

Fig. B.
Vaccina n.º 4578 (purificada)



Evolução typica, sem confluencia das pustulas, apezar do pequeno espaço propositalmente dei-xado entre as escarificações

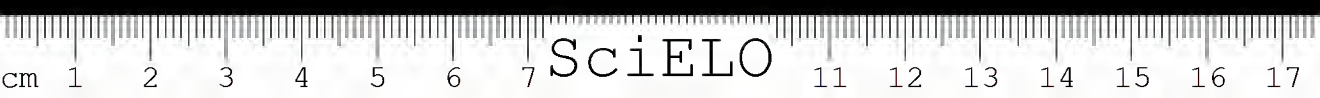
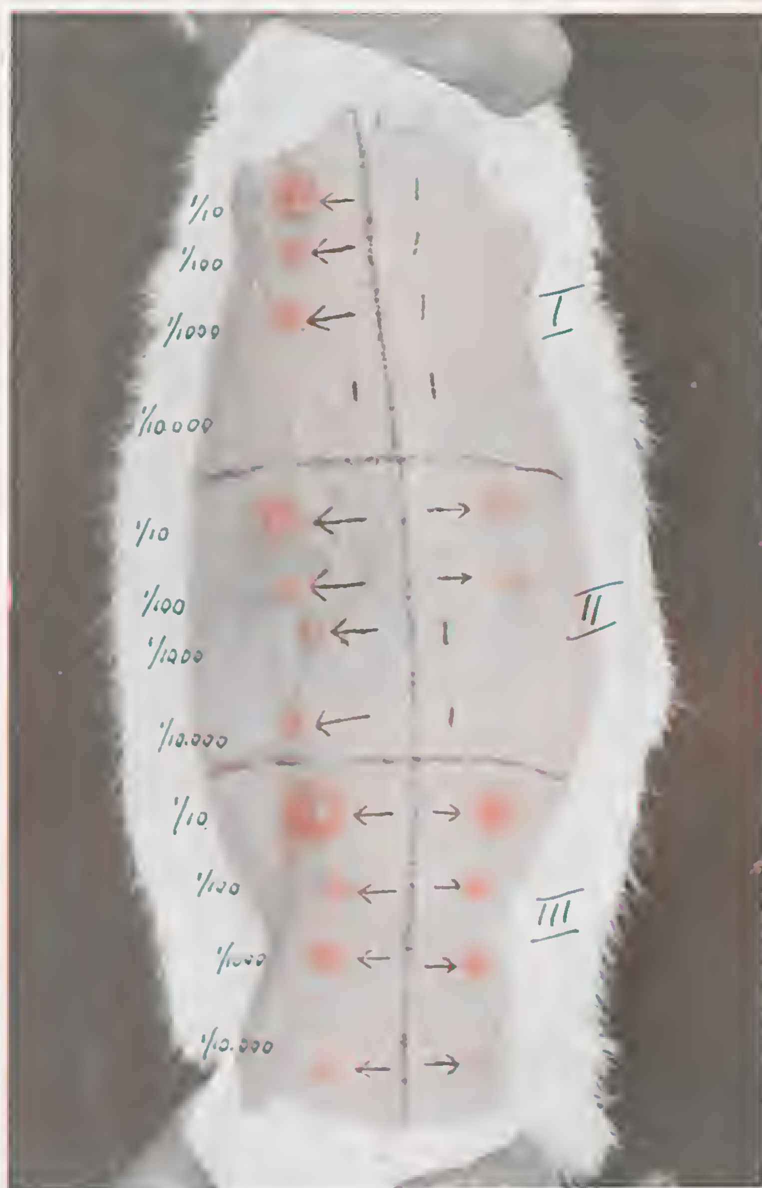
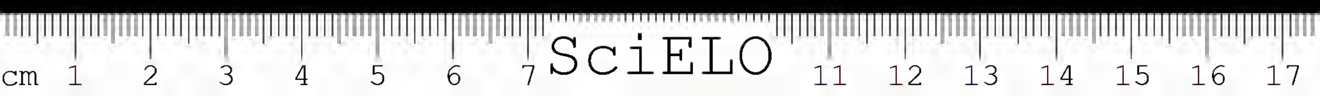

cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

Fig. C.



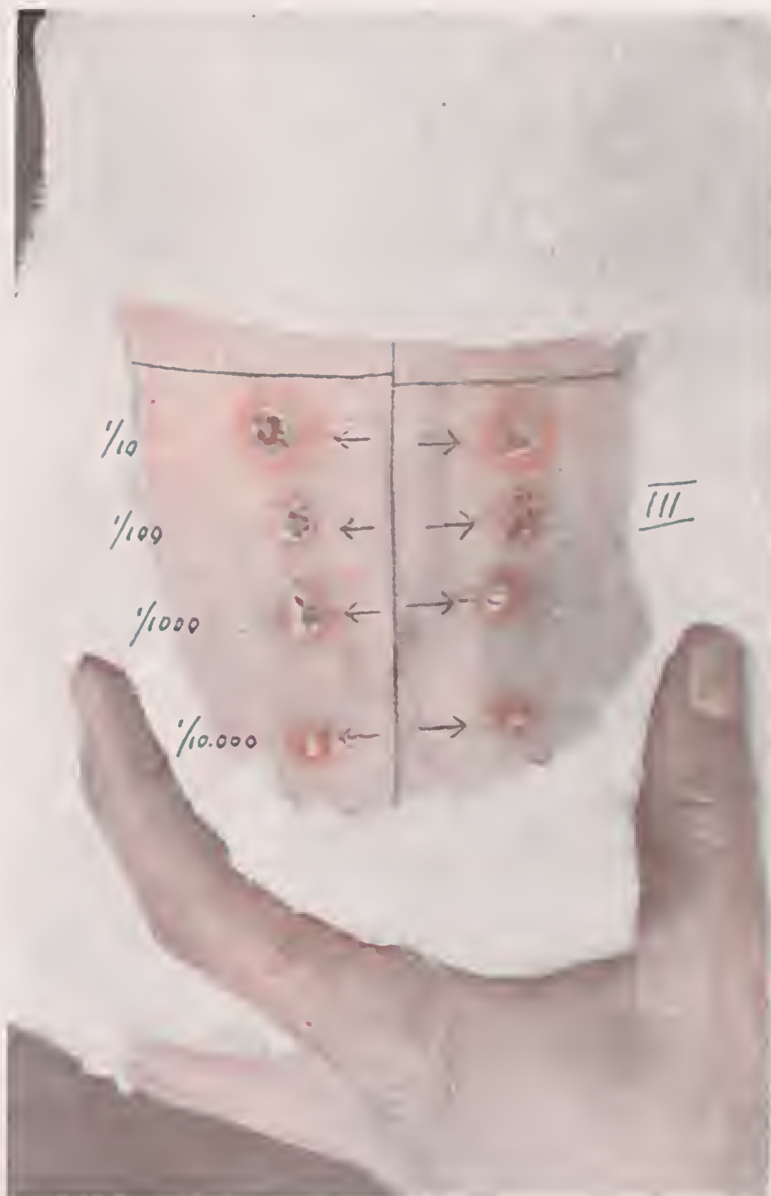
Verificação da actividade da lympha em differentes meios,
pelo methodo de Groth:

a) á esquerda — lympha não filtrada
b) á direita — lympha filtrada
I — em agua physiologica
II — em caldo commum
III — em caldo glycosado

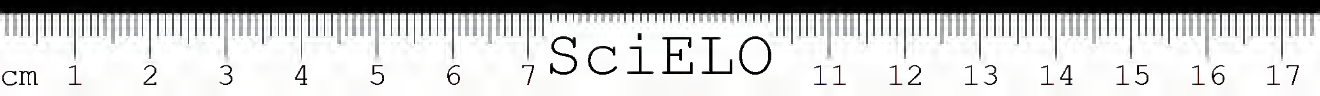

cm 1 2 3 4 5 6 7
SciELO
11 12 13 14 15 16 17

Mem. Inst. Butantan
Vol. V. 1930

Fig. D.



Ampliação da zona III (*a* e *b*) da Fig. C, relativa á verificação, pelo methodo de Groth, da actividade da lympha, não filtrada ou filtrada e suspensa em caldo glycosado


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

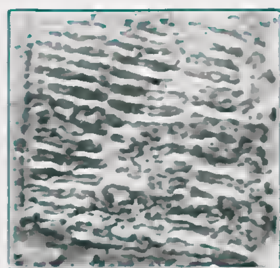


Fig. 1
Evolução da vaccina
no vitello
(virus não filtrado)

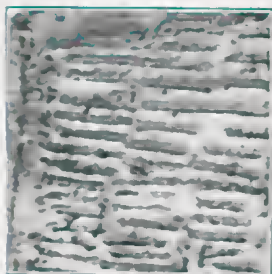


Fig. 2
Evolução da vaccina
no vitello
(virus filtrado fresco)

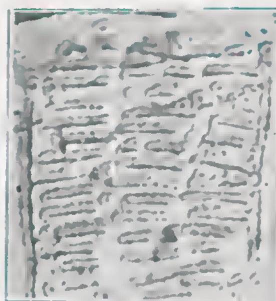


Fig. 3
Evolução da vaccina
no vitello
(virus filtrado de 2 mezes)

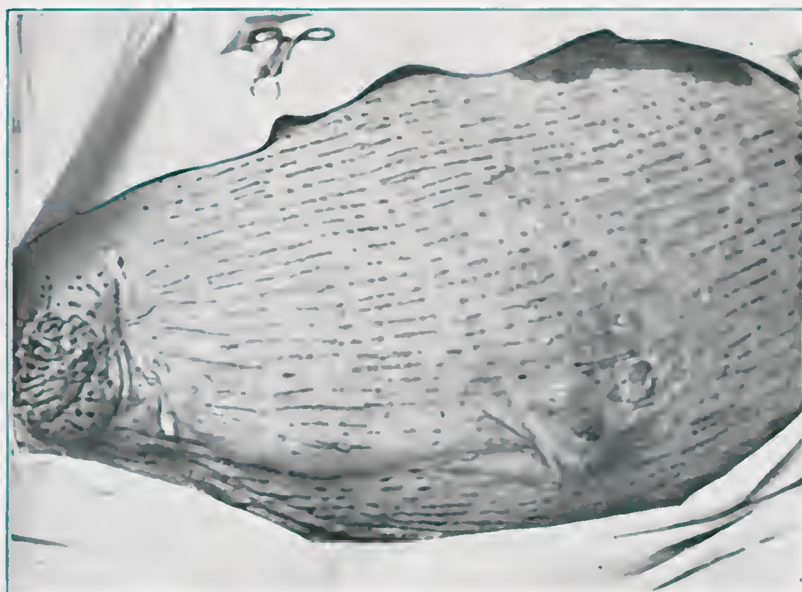
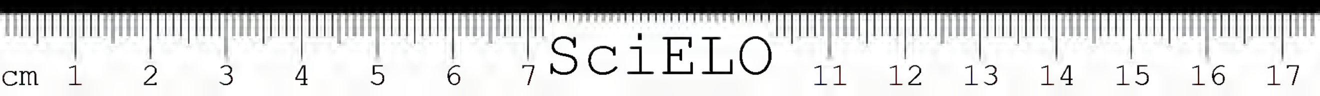


Fig. 4
Vaccinação do vitello com virus filtrado para producção industrial


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

Mem. Inst. Butantan
Vol. V. 1930

Vaccinação humana com virus filtrado



Fig. 5
Caso da observação n.° 21

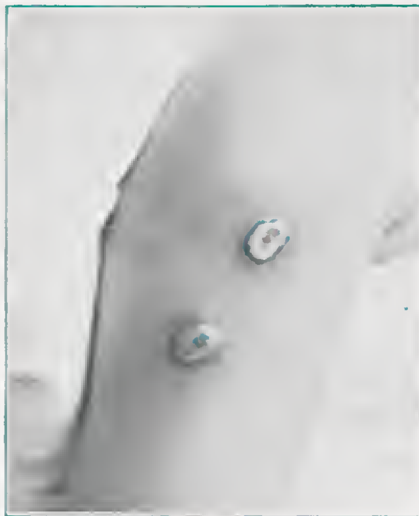


Fig. 6
Caso da observação n.° 6

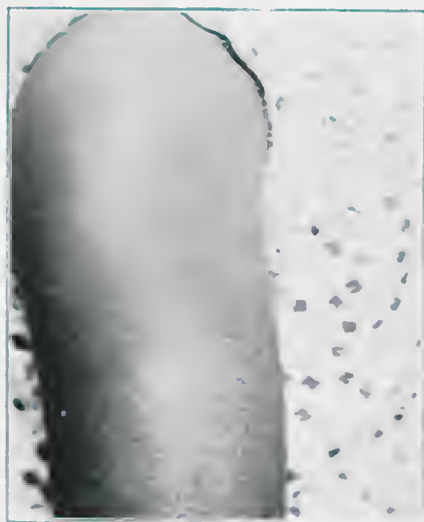
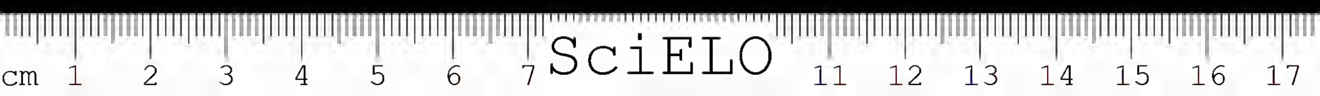


Fig. 7
Cicatrizes após 3 mezes



Fig. 8
Cicatrizes após 3 mezes


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

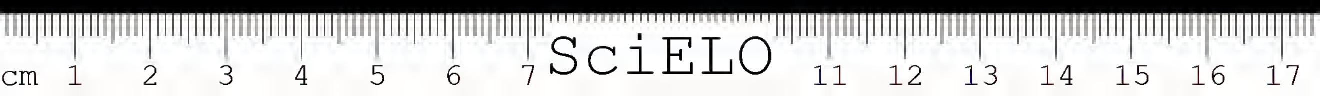
SOBRE O PHENOMENO DE D'HÉRELLE

O BACTERIOPHAGO NAS POLPAS VACCINICAS GLYCERINADAS.
CONSIDERAÇÕES SOBRE A NATUREZA DO PHENOMENO

POR

J. LEMOS MONTEIRO




cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

SOBRE O PHENOMENO DE D'HÉRELLE

O BACTERIOPHAGO NAS POLPAS VACCINICAS GLYCERINADAS. CONSIDERAÇÕES SOBRE A NATUREZA DO PHENOMENO (*)

POR

J. LEMOS MONTEIRO

Poucos são os trabalhos que se referem a pesquizas de principios lyticos, com os caracteristicos do bacteriophago, nas polpas vaccinicas glycerinadas.

Twort, em 1915, semeando a lympha vaccinica em tubos de gelose, verificou, após 24 horas a 37°, areas de aspecto aquoso e observou que, nas culturas onde se desenvolviam os micrococcos, as colonias destes tornavam-se vitreas e transparentes. Uma cultura pura de micrococco, isolado da lympha, tocada com um fragmento da colonia transparente, tomava este aspecto, sendo logo toda invadida.

Este principio transparente, mesmo diluido a 1 por 1.000.000 em solução physiologica, atravessa facilmente os filtros finos de porcelana, sendo uma gotta do filtrado, espalhada n'um tubo de gelose, sufficiente para tornal-a impropria á cultura do micrococco. Se este for semeado, logo que começa a desenvolver-se, a cultura mostra pontos transparentes, que se estendem por toda a superficie do meio, dependendo a intensidade do phenomeno da diluição do material original.

Este estado ou doença dos micrococcos, como o chamou Twort, pode ser transmittido em serie, n'um numero infinito de gerações, sempre á custa dos micrococcos.

Esta observação de Twort é anterior á primeira communicação de d'Hérelle sobre o phenomeno da bacteriophagia.

D'Hérelle, baseando-se na propria descripção de Twort, não identifica a verificação deste com o phenomeno que descreve pela primeira vez dois annos depois.

Assignala d'Hérelle que no phenomeno de Twort "*não se trata de uma lyse, dissolução de uma bacteria*", ha uma fragmentação dos coccos, tratando-se, pois, de um phenomeno de bacterioclasia. Diz mais que na bacteriophagia o que se produz é uma *dissolução total* do corpo microbiano, sem nenhum residuo.

(*) Trabalho entregue para publicação em agosto de 1929.



E' surprehendente o facto de não serem bastante numerosos os trabalhos referentes a pesquisas, segundo a technica de d'Hérelle, do bacteriophago nas polpas vaccinicas.

Somente Gratia, tendo isolado de uma polpa vaccinica um bacteriophago para o estaphylococco, cita pesquisas que fez a respeito e pelas quaes procura mostrar a identidade do phenomeno de d'Hérelle com o de Twort.

Segundo d'Hérelle, porém, a verificação de Gratia mostra sómente que na polpa vaccinica podem ser encontrados os dois principios que provocam os phenomenos da bacterioclasia e o da bacteriophagia.

Sabemos que na polpa vaccinica, ao lado de elementos cellulares e do virus, se encontra associada uma flora microbiana, impossivel de ser evitada e na qual predominam os coccos (micrococcos e estaphylococcos).

Por outro lado, durante o periodo de evolução das pustulas, 5 dias geralmente, é quasi que impossivel evitar a contaminação fecal do campo vaccinado do vitello (região thoraco-abdominal). E antes da colheita, por maiores que sejam os cuidados (lavagens repetidas com agua esterilizada, sabão e escova e agua esterilizada pura, por fim) é razoavel acreditar-se na persistencia dessa contaminação da polpa, principalmente por elementos, como o bacteriophago, por ventura existente nas fezes do vitello. Isto porque a existencia deste principio, quando verificada em culturas e em condições que não falam muito a favor da hypothese invocada por d'Hérelle - de um virus autonomo parasita das bacterias, - tem sido explicada pela contaminação por este "virus" cujo habitat principal é o intestino do homem e dos animaes e que é dotado de grande ubiquidade, capaz de atravessar a parede intestinal e infectar os orgams (razão porque pode ser encontrado em productos de origem organica, no sangue, em exudatos etc.) e existente nas aguas dos rios, nos esgotos, na terra, e em tudo que fôr susceptivel de soffrer, directa ou indirectamente, a contaminação fecal.

O modo de acção de principios lyticos porventura existentes nas polpas vaccinicas, nos daria indicações valiosas para o conhecimento de sua natureza e origem.

Como pesquisas preliminares procurámos verificar a existencia do bacteriophago no conteúdo intestinal dos vitellos normaes e vaccinados.

Resumiremos, a seguir estes resultados, apezar de já publicados alhures.

Capitulo I

O bacteriophago no intestino dos vitellos normaes e vaccinados

E' relativamente facil a verificação da presença do bacteriophago no intestino do homem e dos animaes normaes. No homem, essa presença se assignala desde o 4.° dia após o nascimento (Vedrenne, Suranyi et Kramer), coincidindo com o apparecimento da flora microbiana. Nos individuos normaes, geralmente o principio lytico tem preferencia para o bacillo coli, hospede habitual do intestino, podendo aquelle principio agir tambem sobre outros germes, saprophytas e pathogenos, para os quaes o conteúdo intestinal se torna um habitat favoravel. Entre os germes pathogenos a acção tem-se estudado principalmente em relação aos bacillos dysentericos, typhico, paratyphicos, etc.

Nos animaes e aves, a acção do phago existente no conteudo intestinal se exerce mais facilmente sobre os dysentericos, typhicos e paratyphicos (d'Hérelle).

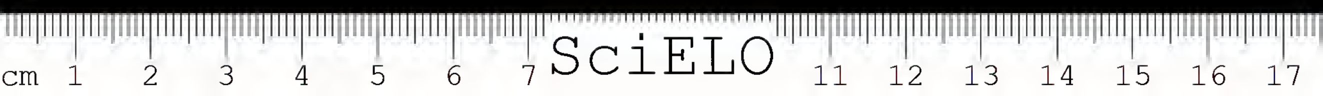
Nas verificações feitas em 6 bovinos, d'Hérelle nos mostra os resultados seguintes: no 1.°, vivendo n'uma fazenda onde havia typhose aviaria, encontrou um bacteriophago para o bacillo dysenterico Hiss (+++) e bacillo gallinarum (+); no 2.°, nas mesmas condições o phago encontrado mostrou-se activo para o bacillo coli (++), dysenterico Shiga (++), Flexner (+), Hiss (+) e gallinarum (++); no 3.°, vivendo em região indemne de doenças epizooticas, o phago mostrou-se activo para o bacillo coli (+), Shiga (++) e Flexner (++); no 4.°, nas condições do anterior, para o Shiga (++) somente; no 5.°, para o coli (++), Shiga (+++), Flexner (++), Hiss (+) e paratyphico B (++); e no 6.°, o phago existente mostrou-se activo para o coli (+) e Flexner (+). O autor diz possuir, alem destes, outros 42 exemplos comparaveis. Suas verificações foram feitas sobre o b. coli, b. dysentericos (typos Shiga, Flexner e Hiss), b. typhico e paratyphicos A e B, b. do "barbone" e b. gallinarum.

Verificações feitas em vitellos não são assignaladas por d'Hérelle e outros.

Nossas pesquisas foram feitas em 8 vitellos normaes do serviço de vaccina animal do Instituto, n'um dos quaes a verificação foi repetida com material obtido 24 horas após a vaccinação, depois da polpa ter sido colhida e, mais tarde, com o material retirado directamente do recto, por occasião da necropsia do vitello.

A verificação da acção do principio lytico foi feita em relação aos germes do grupo coli-typhico-dysenterico e a estaphylococcos isolados de polpas vaccinicas, ou de origem humana.

Em virtude dos resultados já assignalados por outros autores, referentes á acção dos phagos isolados do conteudo intestinal dos animaes e suas preferencias para os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, e tambem pelos nossos resultados nos 8 animaes examinados, julgamos desnecessario, para o fim que tinhamos em vista, augmentar o numero de verificações.



Technica adoptada.

Com uma espatula esterilizada retiram-se cerca de 20 grs. de fezes recentemente emittidas pelo vitello, escolhendo-se uma parte central e que não tenha soffrido contacto com o exterior e colloca-se n'uma placa esterilizada. Em seguida, este material é introduzido n'um balão contendo 100 c.c. de caldo commum e levado para a estufa a 37°, onde se conserva durante 24 horas.

No fim deste tempo, o caldo turvo com a cultura obtida é filtrado em papel grosso, fino e por fim em vela Chamberland L5, sob uma pressão negativa de 30 a 40 cm. de mercurio.

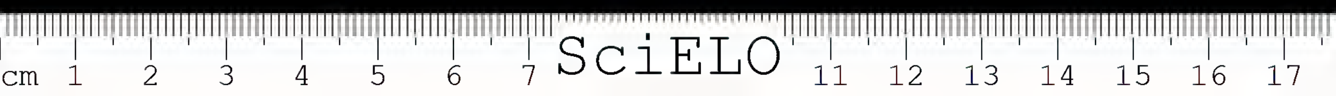
Com o filtrado obtido, fazem-se as verificações da sua acção lytica em relação ás differentes especies microbianas. Para avaliar, até certo limite, a actividade do principio lytico, porventura existente no filtrado, para cada typo microbiano, tomamos 4 tubos com 9 c.c. de caldo commum (reacção pH=7,6). No 1.° collocamos 1 gotta do filtrado; no 2.°, 10 gottas; no 3.°, 2 c.c., e no 4.°, testemunha, não é collocado o filtrado. Em seguida, juntamos para cada tubo 1 c.c. de cultura em caldo, de 18 a 24 horas, da especie microbiana a ser verificada. Os tubos são agitados, apresentando-se, conforme o germe usado, mais ou menos opalescentes; depois, são levados para a estufa a 37°. Após 24 horas, faz-se a verificação dos resultados, observando-se o aspecto das culturas comparativamente ao tubo testemunha.

Neste tubo, testemunha, costumamos semear uma alça apenas da cultura, em vez de 1 c.c. como nos outros 3 tubos da verificação propriamente; desta forma é muito grande a differença de quantidade de germes no tubo testemunha e nos com o filtrado e mais evidente se mostrará a acção deste sobre a emulsão microbiana; tambem se saberá se o meio é bastante favoravel para o germe em apreço, partindo-se de menor quantidade de semente ou se é lysogeno, facto que melhor pode ser evidenciado nestas condições.

Uma vez verificado o resultado no caldo (turvação ou dissolução mais ou menos completa), retira-se de cada tubo uma alça carregada e passa-se em estria, sobre um tubo com gelose inclinada, que receberá o numero correspondente.

Os tubos de gelose são levados e conservados na estufa a 37° durante outras 24 horas, depois do que se verifica a existencia, ao longo da estria praticada, de colonias atypicas, influenciadas pelo bacteriophago e que são caracteristicas do phenomeno de d'Hérelle.

Depois desta verificação em meio solido é que se pode ter ideia da existencia ou não de um phago na cultura, pois muitas vezes, embora turvo o meio liquido, só esta verificação põe em evidencia a existencia do principio lytico. Quando este é muito activo, além da dissolução dos germes no caldo, não se observa desenvolvimento de colonias, mesmo atypicas, na estria em gelose, no tubo correspondente a 1 gotta do filtrado; quando de actividade pequena, no tubo com 2 cc. do filtrado e turvo em caldo, se verificam na gelose raras "plages" ou raras franjas caracteristicas. Entre estes 2 extremos vêem-se os aspectos decorrentes



QUADRO N.º 1

N.º do vitello	Estaph 45E1	Estaph 45E2	Estaph 45E3	Estaph 46E1	Estaph 46E2	Estaph 46E3	Estaph 38E1	Estaph 38E2	Estaph S. Casa	Estaph M. C.	B. dys. Shiga 980	B. dys. Flexner 2	B. typhico Amparo	B. paratyphico A. 145	B. paratyphico B-3	B. coli communis 14	B. coli communior 13
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+++
54 normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++	0	0	0	0	0
54 24 horas após a vaccinação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++	0	0	0	0	0
54 10 dias após a vaccinação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	0	0
54 15 dias após a vaccinação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	0	0	0

das diversas actividades e proporções do bacteriophago por ventura existente. No tubo testemunha, a estria em gelose deve ter sempre o aspecto de uma cultura normal.

Resultados.

Os resultados verificados com o material de 8 vitellos estão resumidos no quadro annexo.

A actividade assignalada no quadro é a correspondente ao 2.º tubo, com 10 gottas do filtrado, após a verificação em gelose.

Os signaes significam:

+: cultura ao longo da estria em gelose, notando-se raras zonas claras e colonias atypicas;

++: idem, observando-se numerosas zonas claras e colonias atypicas;

+++: cultura interrompida ao longo da estria, com largos espaços claros com colonias atypicas;

++++: estria quasi toda clara, observando-se apenas raras colonias atypicas, influenciadas;

+++++: não se observa colonia alguma, ficando toda a estria clara e o meio com apparencia de esteril;

0: cultura em estria, de aspecto normal, semelhante ao tubo testemunha.

Os typos microbianos sobre os quaes foi pesquisada a acção dos filtrados foram representados por germes do grupo coli-typhico-dysenterico (b. dysenterico Shiga 980, da collecção, e Flexner 2, b. typhico Amparo, b. paratyphico A 145, b. paratyphico B 3, b. coli communis 14 e coli communior 13) e coccos (estaphyl. 45E1, 45E2, 45E3, 46E1, 46E2, 46E3, 38E1, 38E2, isolados de polpas vaccinicas e estaphyl. Sta. Casa 1 e M.C., de origem humana).

Destes resultados experimentaes verifica-se que, n'um dos vitellos, o de n.º 54, antes de ser vaccinado, isto é, no estado normal, se encontra no conteudo intestinal um principio lytico cuja actividade se manifesta unicamente para o bacillo dysenterico, typo Flexner 2 da collecção. Realizámos 2 passagens em serie sobre este typo microbiano e, embora a exaltação do principio lytico não se accentuasse muito, apresenta elle todos os caracteristicos do bacteriophago. Este vitello foi escarificado na região thoraco-abdominal com o virus vaccinico, para o serviço de vaccina animal e 24 horas depois é de novo pesquisado o bacteriophago nas fezes. Encontra-se um principio identico ao verificado anteriormente. Após 10 dias da vaccinação e 5 da colheita da polpa, a pesquisa é repetida e o resultado ainda é identico, parecendo, porém, ter havido uma diminuição da actividade do phago em relação ao germe. Por fim, 15 dias após a vaccinação e 10 da colheita da polpa, o animal é sacrificado, por exigencia do serviço de vaccina. Durante

a necropsia, é feita a colheita do material directamente do recto, depois de seccionada a parede intestinal, com todos os cuidados de asepsia. Neste material, com a mesma technica já descripta, se nota agora que o principio lytico existente deixa de agir sobre o b. dysenterico Flexner 2, para agir sobre o b. dysenterico Shiga 980, embora sua actividade não seja muito accentuada.

Nos outros vitellos normaes, apenas com uma excepção, se encontram principios lyticos que agem sobre germes pertencentes ao grupo coli-typho-dysenterico, de preferencia para os typos Shiga e Flexner.

Em nenhum foi encontrado um bacteriophago que agisse sobre os coccos, quer isolados de polpas vaccinas, quer de origem humana.

Quanto ao numero de especies microbianas estudadas, pode-se allegar talvez que, se maior fosse o numero de typos de coccos (estaphylococcos, micrococcos, etc.), possivel seria encontrar algum sobre o qual a influencia se manifestaria. No entanto, o numero de representantes do grupo coli-typhico-dysenterico foi ainda mais reduzido do que o de coccos e mesmo assim um ou outro typo daquelle grupo, e ás vezes mais de um, se mostrou influenciado pelo phago existente no conteudo intestinal do animal.

A polpa vaccinica do vitello 18, recebe o numero 4538; do vitello 31, o numero 4545; do vitello 54, o numero 4568 e do vitello 55, o numero 4569. Nestas polpas, assim como em outras em differentes periodos de permanencia no frigo, são feitas pesquisas relativas á presença do bacteriophago e sua acção, e os resultados serão dados a seguir.

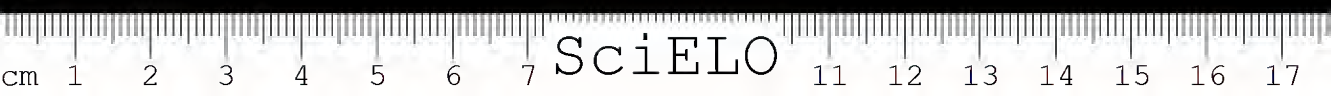
Capitulo II

O bacteriophago nas polpas vaccinicas glycerinadas

Veremos agora os resultados obtidos com as pesquisas praticadas nas polpas vaccinicas glycerinadas, em differentes periodos de permanencia no frigo de -5° a -8°C., algumas provenientes de vitellos em cujas fezes esta verificação havia tambem sido feita.

Technica adoptada.

A polpa vaccinica, depois de colhida e pesada, é geralmente addicionada de 3 a 4 partes do seu peso de glycerina pura, neutra (Schering). Depois de emulsionada com uma espatula é collocada no apparelho triturador, onde soffre uma primeira trituração grossa que torna mais intimo o contacto da glycerina; em seguida, a polpa é levada para um apparelho "frigo" onde é mantida n'uma temperatura que oscilla entre -5° e -8°C.



Para a pesquisa do bacteriophago na polpa vaccinica tomamos 1 c.c. da emulsão glycerinada e semeamos em 100 c.c. de caldo commum. Incubação a 37° durante 24 ou 48 horas (*).

No fim deste tempo o caldo apresenta-se turvo em virtude do desenvolvimento dos germes contidos na polpa semeada; a cultura é filtrada em papel e em vela Chamberland L2 ou L5, sob pressão negativa de 30 a 40 cm. de mercurio.

Com o filtrado fazem-se as verificações da sua acção lytica em relação a culturas recentes das differentes especies microbianas.

Para cada germe tomam-se 4 tubos com 9 c.c. de caldo commum (pH=7.6); no 1.°, colloca-se 1 gotta de filtrado, no 2.°, 10 gottas, no 3.°, 2 c.c. e no 4.°, que servirá de testemunha, não se junta o filtrado. Addiciona-se em seguida, 1 c.c. da emulsão microbiana (cultura em caldo de 18 a 24 horas). Os tubos são agitados e levados para a estufa a 37°, durante 24 horas.

No tubo testemunha costumamos tambem semear apenas 1 alça da cultura em caldo, em vez de 1 cc. como nos outros 3, sendo, por isso, consideravel a differença de quantidade de germes nestes em relação áquelle. Esta technica tem a vantagem de mais seguramente evidenciar a possivel acção lytica do filtrado; mostra tambem se o meio é favoravel ao desenvolvimento da cultura, partindo de menor porção de germes e dá ainda indicações sobre se a cultura é ou não lysogena, facto que assim melhor se revela.

Verificado o resultado no caldo, uma alça carregada de cada tubo é passada em estria sobre a gelose inclinada em outro tubo que receberá o numero correspondente.

Os tubos de gelose são levados para a estufa a 37° durante 24 horas, verificando-se então o aspecto da cultura desenvolvida ao largo da estria (aspecto normal, existencia de "plages" ou zonas claras, colonias atypicas, influenciadas, etc.) e que nos dará informações sobre a existencia e actividade do principio, de accordo com as varias proporções do filtrado ajuntado em relação ao germe em apreço.

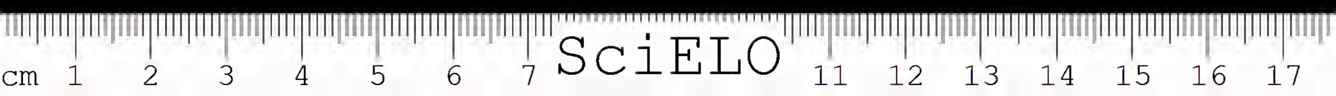
Só depois desta verificação em meio solido é que se pode ter uma ideia da existencia ou não de um phago na cultura, pois muitas vezes, embora turvo o caldo, é ella que vem evidenciar o phenomeno.

Parte experimental.

I. *Polpa n.°* 4569 (proveniente do vitello 55 (**), semeada immediatamente após a colheita e addição de glycerina e de ter soffrido uma primeira trituração grossa.

(*) N'uma polpa semeada em balão que permaneceu 10 dias a 37°, verificámos o mesmo resultado observado após 48 horas apenas.

(**) Antes da colheita da polpa, após a lavagem, havendo reacção inflammatoria local um pouco intensa, faz-se agir, sobre a zona vaccinada, uma solução de verde brilhante a 1:50.000, durante 10 minutos. O corante é eliminado por varias lavagens com agua esterilizada e o campo é enxuto, procedendo-se a colheita.



A acção lytica do filtrado da cultura é verificada em relação aos germes abaixo assignalados, sendo o resultado indicado observado no tubo onde se addicionaram 10 gottas do filtrado:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	L L	++++
,, 45E2	T	0
,, 45E3	T	0
,, 46E1	T	0
,, 46E2	T	0
,, 46E3	T	0
,, 38E1	T	0
,, 38E2	T	0
,, 47E1	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Os signaes com que assignalamos os resultados com 10 gottas do filtrado (2.° tubo) têm a seguinte significação:

T - turvação (como no tubo testemunha);

L - lyse ou dissolução apenas perceptivel;

LL - lyse ou dissolução incompleta;

LLL - lyse ou dissolução completa.

+ - cultura ao longo da estria, notando-se raras zonas claras e colonias atypicas;

++ - idem, observando-se numerosas zonas claras e colonias atypicas;

+++ - cultura interrompida ao longo da estria, com largos espaços claros com colonias atypicas;

++++ - estria quasi toda clara, observando-se apenas raras colonias atypicas influenciadas;

+++++ - não se observa colonia alguma, ficando toda a estria clara e o meio com a apparencia de esteril;

0 - cultura em estria, de aspecto normal, semelhante ao tubo testemunha.

Esta polpa é proveniente do vitello n.° 55 em cujo conteudo intestinal se encontrou um bacteriophago activo (++) para o bacillo dysenterico Flexner 2.

Verifica-se, pelo resultado acima, que ella possue, depois de emulsionada em glycerina e antes de ter permanecido no frigo, um principio lytico que age sobre um dos typos de estaphylococcos empregados (estaphl. 45E1), não tendo acção sobre os outros e sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

II. *Polpa n.º* 4545 (proveniente do vitello 31). Colheita, addição de glycerina, primeira trituração grossa e collocação no frigo em 21/5/928.

Parte da cultura é filtrada após 48 horas e o restante após 10 dias de permanencia a 37°.

Resultado da acção do filtrado da cultura de 48 horas:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	0
" 45E2	T	0
" 45E3	T	+ +
" 46E1	T	0
" 46E2	T	0
" 46E3	L L L	+ + + +
" Sta. Casa 1 (*) . . .	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Esta polpa provém do vitello n.º 31 em cujo conteudo intestinal foi verificada a presença de um bacteriophago para o bacillo dysenterico Shiga 980 (+++).

Pelo resultado acima vê-se que ella contém um bacteriophago activo para 2 dos typos de estaphylococcos verificados (45E3, isolado desta propria polpa e 46E3) para o qual a actividade é maior, não mostrando acção sobre os outros, mesmo d'ella tambem isolados (45E1 e 45E2), nem sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

Os 3 tubos da verificação sobre o estaphylococcos 46E3 são filtrados e, fazendo-se 3 passagens em serie sobre este germe, nota-se a exaltação da actividade do filtrado após cada passagem.

O resultado da actividade após a primeira passagem pode ser verificado pela photographia da fig. 1.

(*) De origem humana.

Resultado da acção do filtrado da cultura após 10 dias de estufa a 37°:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	0
„ 45E2	T	0
„ 45E3	T	+ +
„ 46E1	T	0
„ 46E2	T	0
„ 46E3	T	+ + +
„ Sta. Casa 1 (*) . . .	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Verifica-se assim que, após 10 dias, o principio lytico existente é semelhante ao observado após 48 horas, parecendo apenas que sua actividade tenha diminuido um pouco.

Com este phago realizamos tambem 3 passagens sobre o estaph. 46E3, sendo que sua exaltação, após as passagens, foi menos accentuada do que com o filtrado de 48 horas.

III. *Polpa n.°* 4568 (proveniente do vitello 54). Colheita, addição de glycerina, primeira trituração grossa e collocação no frigo em 17/7/928.

Semeada para a pesquisa do bacteriophago após 2 mezes de permanencia no frigo. Verificação da acção lytica do filtrado da cultura após 24 horas.

No conteudo intestinal do vitello 54 que forneceu esta polpa foram feitas varias verificações quanto á presença do bacteriophago em relação aos mesmos germes do grupo coli-typhico-dys. e alguns dos estaphylococcos agora verificados.

Antes da vaccinação do vitello, verificou-se a presença de um principio lytico para o b. dysenterico Flexner 2, somente; principio lytico identico verifica-se 24 horas e 10 dias após a vaccinação (actividade menor agora), ao passo que, 15 dias após a vaccinação, este principio passa a agir sobre o b. dysenterico Shiga 980.

(*) De origem humana.

Typos microbianos sobre os quaes foi verificada a acção e resultado obtido:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	+ +
„ 45E2	T	0
„ 45E3	L	+ + + +
„ 46E1	T	0
„ 46E2	T	0
„ 46E3	L	+ + + +
„ 38E1	T	0
„ 38E2	T	+
„ 47E1	T	0
„ 52E1	T	0
„ 56E1	T	0
„ Sta. Casa 1 (*) . . .	T	0
„ M. C. (*)	T	0
„ 97 (*)	T	0
„ 98 (*)	T	0
„ 152 (*)	T	0
„ 153 (*)	T	+ +
„ 184 (*)	T	0
B. dysenterico Shiga 980 . . .	T	0
B. dys. Flexner	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Pelo quadro acima vê-se que, após 2 mezes de permanencia no frigo, na polpa proveniente deste vitello, não se constata a presença de phago para esses germes e sim para varios dos estaphylococcos examinados, um delles de origem humana (var. *citreus*, de um caso de furunculose).

IV. *Polpa n.º* 4538 (proveniente do vitello 18). Colheita, addição de glycerina, primeira trituração grossa e collocação no frigo em 20/3/928.

Semeada em caldo na proporção de 1 por 100, para pesquisa do bacteriophago, após 3 mezes e 20 dias.

Cultura a 37° durante 48 horas.

(*) Isolados de casos diversos de origem humana.

Resultado da verificacão da acção lytica do filtrado sobre differentes typos microbianos:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	L	+ + +
„ 45E2	L	+ + +
„ 45E3	L L	+ + +
„ 46E1	L	+ +
„ 46E2	T	+
„ 46E3	L L L	+ +
„ 38E1	T	0
„ 38E2	L L	+ + + +
„ Sta. Casa 1 (*) . . .	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14.	T	0
B. coli communior 13	T	0

No conteudo intestinal do vitello 18, que forneceu esta polpa foi verificada a presença de um bacteriophago activo para o b. dysenterico Flexner 2 (++).

Vê-se que na polpa glycerinada, colhida deste vitello, após ter permanecido mais de 3 mezes a -8°C., não se constata phago para os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mas sim para diversos estaphylococcos empregados, com excepção de 2 apenas (um, typo Sta. Casa, isolado de um caso de phlegmão da coxa e outro typo 38E1, isolado da propria polpa). Os outros typos de estaphylococcos são oriundos de polpas vaccinicas, sendo o 38E2 da polpa homologa (**).

As photographias das figuras 2, 3 e 4 mostram os resultados obtidos com o principio lytico da polpa n.° 4538 em relação aos estaphylococcos sobre os quaes mostrou acção, sendo apenas vistos os resultados da verificação em gelose nos tubos aos quaes se juntaram, respectivamente, 10 gottas e 2 c.c. do filtrado, comparativamente com o tubo testemunha.

V. *Polpa n.°* 4512 colhida em 27/9/927. Depois de submettida ás diversas phases do preparo, soffreu a 2.ª trituração fina, tamisação e extracção do excesso

(*) De origem humana.

(**) Os numeros dados aos estaphylococcos isolados de polpas correspondem aos dois algarismos finaes da polpa donde provêm, sendo os seus dois primeiros algarismos o numero 45. Assim o estaphylococco 38E1 provem da polpa n.° 4538; o estaphylococco 45E1 provem da polpa 4545 e assim por diante.

de ar, sendo conservada no frigo, para experiencias sobre o tempo de duração da actividade do virus.

Em 27/8/928, isto é, 11 mezes após a permanencia no frigo, é semeada na proporção de 1 c.c. de polpa para 100 de caldo commum, para a pesquisa do bacteriophago. Incubação a 37° durante 48 horas; filtração em Chamberland L2 e verificação da acção lytica do filtrado sobre os germes constantes do quadro abaixo, com os respectivos resultados:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	L	0
„ 45E2	T	0
„ 45E3	L	+ + +
„ 46E1	T	0
„ 46E2	T	0
„ 46E3	T	+ +
„ 38E1	T	0
„ 38E2	T	0
„ 47E1	T	+
„ 52E1	T	0
„ 56E1	T	0
„ Sta. Casa 1 (*) . . .	L	0
„ M. C. (*)	L L L	+ + + +
„ 97 (*)	T	0
„ 98 (*)	T	0
„ 152 (*)	T	0
„ 153 (*)	L L	+ + +
„ 184 (*)	T	+ +
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Verifica-se assim que, mesmo após quasi 1 anno de permanencia a -8°C, nesta polpa, apenas com a cultura de pequena quantidade em caldo durante 48 horas e filtração, se evidencia um principio lytico capaz de agir sobre culturas recentes de diversos typos de estaphylococcos, varios de origem humana, o qual não manifesta acção sobre germes do grupo coli-typhico-dysenterico. A actividade da polpa vaccinica 4512, verificado mais ou menos nesta occasião (18/8/28), segundo o methodo de Gins, dá uma reacção positiva (++) até a diluição de

(*) De origem humana.

1/10.000. O numero de germes por c.c. de polpa bruta glycerinada (portanto, não diluida) é de 120.000.

No quadro acima observa-se que, ás vezes, pela simples inspecção do resultado em caldo pode-se pensar na dissolução, lyse, das bacterias e que é indispensavel, para se ter a certeza da acção bacteriophagica, proceder-se a verificação em gelose.

VI. *Polpa n.º* 4545 (2.ª verificação) após 110 dias de permanencia no frigo.

Os resultados da verificação da acção lytica do filtrado constam do quadro seguinte:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	+ +
„ 45E2	T	0
„ 45E3	T	+ + +
„ 46E1	T	0
„ 46E2	T	0
„ 46E3	T	0
„ 38E1	T	0
„ 38E2	T	+ +
„ 47E1	T	0
„ 52E1	T	0
„ 56E1	T	0
„ Sta. Casa 1 (*) . . .	T	0
„ M. C. (*)	T	0
„ 97 (*)	T	0
„ 98 (*)	T	0
„ 152 (*)	T	0
„ 153 (*)	T	0
„ 184 (*)	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145 . . .	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14.	T	0
B. coli communior 13	T	0

Esta polpa é proveniente de um vitello em cujo conteudo intestinal se evidenciou um bacteriophago para o b. dysenterico Shiga 980 (+++). No fim de 16 dias de permanencia no frigo a acção do phago n'ella existente está indicada na experiencia II. Agora, depois de 110 dias de permanencia a -8°C, esta acção differe um pouco da verificada n'aquella occasião, como se pode ver comparando os 2 resultados. Com 16 dias, actua sobre os typos 45E3 (isolado da propria

(*) De origem humana.

polpa) e 46E3; com 110 dias, age sobre os typos 45E1 e 45E3 (isolados da propria polpa) e sobre o 38E2. Em ambas as occasiões, agiu sobre o estaphylococco 45E3; com 16 dias, deixou de agir sobre o 45E1 e com 110 dias deixou de ter acção sobre o estaphylococco 46E3.

Este facto é interessante e mostra que modificações do meio, operadas durante o periodo de permanencia no frigo, devem ter influido na elaboração e modificação da actividade do principio da lyse transmissivel.

Antes de passar á discussão destes resultados experimentaes, devemos dizer que todos os germes empregados nestas experiencias soffreram, antes da sua utilização, numerosas repicagens em caldo commum e gelose inclinada, dando sempre culturas de aspecto normal. Sómente 2 typos se mostravam lysogenos e foram logo eliminados das verificações: um de origem humana (Estaphyl. 183) e outro isolado de uma polpa vaccinica (Estaphyl. 52E2).

Capitulo III

Discussão e considerações sobre a natureza do phenomeno

Verificamos, nas pesquisas preliminares, que no conteúdo intestinal dos vitellos normaes se encontra um bacteriophago que age sobre germes do grupo coli-typhico-dysenterico e que em nenhuma occasião manifestou acção sobre os coccos (estaphylococcos). Vemos agora que, nas polpas vaccinicas glycerinadas, em differentes periodos de permanencia no frigo (de 16 dias e 11 mezes) e mesmo immediatamente após a colheita e addição de glycerina, se evidencia facilmente, pela technica que descrevemos, a presença de principios lyticos que somente agem sobre os estaphylococcos e que em nenhuma occasião manifestaram acção sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo quando as polpas de onde foram isolados eram provenientes de vitellos em cujo conteudo intestinal haviamos previamente verificado a presença de um bacteriophago para germes deste ultimo grupo.

Acceitando-se a hypothese de d'Hérelle, é muito razoavel, como assignalámos no inicio deste trabalho, pensar-se n'uma contaminação fecal da polpa vaccinica, onde se deveria encontrar um protobio semelhante ao existente no conteudo intestinal do vitello.

Mesmo na hypothese de uma adaptação do virus ao novo meio (impossivel pela experiencia 1), a natureza de um organismo preformado e parasita, como quer d'Hérelle, não pode receber o apoio destes nossos resultados experimentaes.

Sabemos que quanto mais simples é o ser vivo, maior é a sua faculdade de adaptação e, como consequencia, maior a sua variabilidade. Segundo d'Hérelle,

o bacteriophago (*Protobio bacteriophagus*, syn. *Bacteriophagum intestinale*) possue estes attributos, alem de outros que são apanagio dos seres vivos. Nesta hypothese, podendo adaptar-se ao novo meio (polpa glycerinada) e agir sobre germes nelle contidos, o "virus" não deveria perder seus caracteres originaes, quando em condições propicias. Por isto, em contacto novamente com germes do grupo coli-typhico-dysenterico, para os quaes agia antes desta adaptação a germes de natureza differente (estaphylococcos), deveria evidenciar sua acção primitiva.

Acceitando-se a possibilidade de uma contaminação fecal, sempre tão facil e lembrada em estudos sobre o bacteriophago, devemos admittir então que este "virus", proveniente do intestino do vitello, se tenha inactivado ou morrido na polpa vaccinica glycerinada, mesmo na recemcolhida, surgindo outro de natureza e modo de acção differentes.

E' evidente a existencia de uma certa relação entre o bacteriophago isolado e os germes existentes no meio, quer normalmente, quer sob determinadas circunstancias, e na sua elaboração a influencia da flora microbiana é incontestavel, não sendo desrazoavel acreditar-se no papel da concorrencia vital entre as varias especies e outras "influencias", tanto do meio, como dos germes.

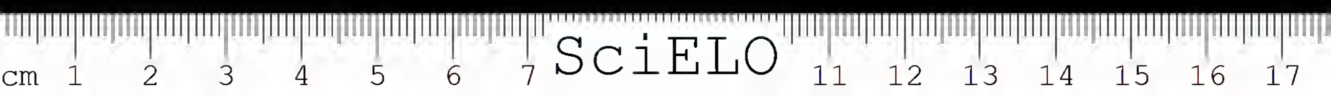
Nestas condições, se poderia considerar o "virus" bacteriophago como um elemento oriundo dos proprios germes, cuja formação seria provocada por "influencias" que se encontram no conteúdo intestinal dos animaes, na polpa vaccinica glycerinada, na agua dos rios, nos esgotos, na terra, etc., onde este principio lytico tem sido verificado.

Se os resultados experimentaes assignalados não autorizam, por si sós, esta deducção sobre a natureza do phenomeno, parece-nos ser ella perfeitamente acceitavel tendo-se em conta tambem os trabalhos experimentaes de grande numero de autores.

N'uma revisão da já vasta bibliographia sobre a bacteriophagia e das differentes hypotheses propostas para a explicação do phenomeno, um facto resalta quasi sempre: as caracteristicas vitaes do principio lytico, postas em evidencia principalmente por d'Hérelle.

Por outro lado, se recordarmos os estudos sobre o metabolismo bacteriano, tanto no organismo animal, como *in vitro*, sobre as mutações que podem soffrer as bacterias em differentes condições, sobre o phenomeno da dissociação microbiana, tão bem estudado por P. Hadley, se juntarmos a todos estes estudos os do nosso eminente patricio Antonio Fontes, sobre as phases da evolução do bacillo de Koch e sobre o cyclo vital das bacterias e tantos outros, veremos quão complexa é a cyclogenia bacteriana e qual a importancia que devem merecer em nossos dias novos capitulos da bacteriologia relacionados com a biologia dos micro-organismos.

O phenomeno da bacteriophagia ou da lyse transmissivel deve ser tambem collocado entre os que se relacionam com a biologia microbiana. Das differentes theorias propostas para a explicação do phenomeno de d'Hérelle, as chamadas *autogenas*, isto é, para as quaes o principio lytico é oriundo da propria cellula



bacteriana e theorias defendidas, sob differentes modalidades, por Twort, Kabeshima, Bordet, Ciuca e Renau, Wollman etc., tornaram em nossos dias a theoria parasitaria de difficil sustentação.

Juntem-se a isso os trabalhos de Burnet, verificando uma coordenação entre a capacidade de absorpção de agglutininas de certos microorganismos e o que se poderia chamar sua capacidade de absorpção phagica, falando a favor de uma independencia biologica das particulas bacteriophagicas em contradicção com a unidade biologica da theoria de d'Hérelle; tambem em contraposição a esta unidade biologica, a descoberta de Koser relativa a um bacteriophago para uma especie thermophila, agindo a uma temperatura que destroe a maioria dos germes não esporulados e a de Elder e Tanner, com o seu bacteriophago psychophilico, agindo na temperatura de 4°C.

Estes factos e muitos outros que poderiam ser citados, mostram que o bacteriophago está em relação com a cultura onde se desenvolve, e por isto, com a flora microbiana, como assignalamos em nosso trabalho.

As pesquisas, referentes á presença do bacteriophago em culturas de differentes germes, de Bail, Otto e Munter, Lemos Monteiro e outros; as de Hadley, Klimak e Kiesewetter, mostrando que o agente lytico pode ser gerado n'um tubo de caldo unicamente por uma serie de culturas e filtrações successivas; as de Béguet, sobre a influencia da variação da pressão osmotica entre as colloides microbianas e do meio, tendo-se em conta os phenomenos de adsorpção e tensão superficial, na elaboração phenomeno lytico, etc., todas ellas apoiam esse modo de ver.

A cellula microbiana não deve mais ser considerada como uma unidade vital, mas sim constituida por um conjuncto de unidades vitaes que, para certos germes e sob certas condições ou "influencias", se multiplicariam neste estado primordial, invisivel, da materia viva. Nestas condições, poder-se-ia admittir a hypothese de que a bacteriophagia seria a manifestação da multiplicação destas formas invisiveis do proprio germe, assim surgindo sob certas condições e capazes, quando em contacto com formas normaes e visiveis, de transmittir a estas a mesma propriedade.

A relação existente entre o bacteriophago especifico e a cultura onde se desenvolve, suggerindo que o protoplasmo do agente se continua com o da cellula microbiana, serviu a Hadley para formular sua interessante theoria para a explicação do phenomeno. Segundo esta theoria, que Hadley denomina de "homogamica da acção bacteriophagica", ambos os elementos, principio lytico e bacteria sensivel, são componentes necessarios a um mechanismo de reproducção que muitas, senão todas, as bacterias possuem.

Em summa, as controversias existentes sobre o assumpto não repousam no reconhecimento de factos estabelecidos, mas na sua interpretação e não diminuem o valor do incomparavel trabalho de d'Hérelle.

———

CONCLUSÕES

I. No conteúdo intestinal de vitellos normaes encontra-se quasi sempre um bacteriophago, cuja acção se manifesta para germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

II. A acção deste principio lytico em nenhuma occasião se manifestou sobre os coccos (estaphylococcos), quer isolados de polpas vaccinicas, quer de origem humana.

III. Nas polpas vaccinicas glycerinadas mantidas a -8°C. desde alguns dias até quasi um anno, encontra-se um "bacteriophago" cuja acção se manifesta para os coccos (estaphylococcos), quer isolados de polpas vaccinicas, quer de origem humana.

IV. Em nenhuma occasião sua acção se manifestou sobre germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo quando a polpa vaccinica é oriunda de vitello em cujo intestino se encontra um principio lytico agindo sobre germes deste grupo.

V. E' evidente a existencia de uma relação entre o principio lytico isolado e a flora microbiana predominante do meio.

RESUMO

J. LEMOS MONTEIRO (Instituto Butantan, São Paulo). — **Sobre o phenomeno de d'Hérelle. O bacteriophago nas polpas vaccinicas glycerinadas; considerações sobre a natureza do phenomeno.**

O autor fez a pesquisa de principios lyticos com os caracteristicos do bacteriophago nas polpas vaccinicas glycerinadas em differentes periodos de permanencia do frigo a -8°C (de 11 dias a quasi 1 anno), indicando a technica de que se serviu. Muitas das polpas verificadas eram oriundas de vitellos em cujo conteudo intestinal identicas pesquisas haviam sido feitas e são tambem descriptas.

A acção dos phagos existentes nas polpas glycerinadas foi verificada em relação a germes do grupo coli-typhico-dysenterico e a differentes amostras de estaphylococcos.

Ao contrario do que acontece com o principio lytico existente nas fezes do vitello, o verificado nas polpas vaccinicas glycerinadas manifesta acção sobre os estaphylococcos e em nenhuma occasião sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo na recem-colhida.

Sabe-se como é difficil, impossivel mesmo, por maiores que sejam os cuidados, evitar a contaminação fecal do campo vaccinado do vitello. Pela hypothe-



se de d'Hérelle para a explicação do phenomeno, isto é, de um "virus" parasita das bacterias, este elemento existente no conteúdo intestinal do vitello deveria ser encontrado nas polpas vaccinicas e agir sobre os mesmos germes para os quaes agia anteriormente. Isto tambem porque, segundo os defensores desta theoria parasitaria, o bacteriophago é dotado de grande ubiquidade, podendo ser encontrado em tudo que fôr capaz de soffrer directa ou indirectamente a contaminação fecal. O A. verificou que assim não acontece; o bacteriophago encontrado nas polpas vaccinicas sempre mostrou acção sobre os estaphylococcos, isolado de polpas ou de origem humana, e em nenhuma occasião agiu sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo quando oriundas de vitellos em cujo conteúdo intestinal havia verificado a existencia de principio lytico para germes deste ultimo grupo. Em virtude dos resultados experimentaes deste e de outros trabalhos e dos de numerosos experimentadores, o A. mostra uma hypothese que lhe parece razoavel para a explicação de tão interessante phenomeno, que considera ligado á biologia e cyclogenia microbianas.

ABSTRACT

Lytic principles bearing bacteriophage characteristics were found in the glycerin-vaccin lymph as kept in the ice-box at -8°C for a period varying from 11 days to 1 year. Several batches of the lymph were obtained from calves on whose intestinal contents the search for the bacteriophage was also made, in both cases the action of the phage being investigated in regard to staphylococci and germs of the coli-typhoid-dysentery group.

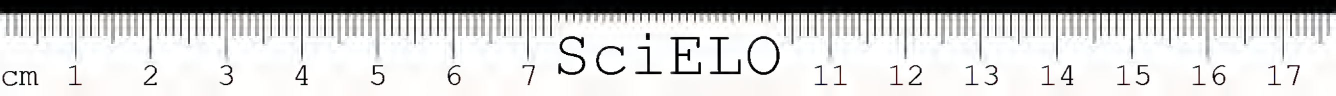
The lytic principle found in the vaccin lymph, even from a recent batch, acts on staphylococci but not on the coli-typhoid-dysentery group, whilst that found in the faeces of calves shows a reverse action. It is known how difficult it is to avoid fecal contamination of the vaccinated region of a calf in spite of any precautions that may be taken in this regard. Should the phage be accepted as a parasite of bacteria, in the light of d'Hérelle's explanation, then the element found in the calf's intestinal content ought to be also found in the vaccin lymph and thus keep its original lytic action on the germs under the same conditions, inasmuch as, in the light of that theory, the bacteriophage is quite ubiquitous, as it uses to occur in any object or place liable of contamination by faeces. This, however, is not the case since the phage found in the vaccin lymph always shows its action on staphylococci of any origin, whilst it never acts on germs of the coli-typhoid-dysentery group even though the lymph proceeds from calves in whose faeces the lytic principle for the latter germs has been found.

The phenomenon seems rather to be related to a special feature of the bacteria cycle life.

REFERENCIAS

Béguet — Arch. Inst. Pasteur d'Algérie V(1):25.1927.
Burnet (F. M.) — British J. Exp. Path. VIII:121.1927.
Elder (A. L.) and *Tanner (F. W.)* — J. Inf. Diseases XLIII(5):403.1928.
Fontes (A.) — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XVIII(1).1925.
Gratia (A.) — Proc. Exp. Biol. & Med. XVIII:217.1921 — C. R. Soc. Biologie LXXXV: 25.1921.
Hadley (P.) — J. Inf. Diseases XL(1).1927 — Ib. XLII(4).1928.
Hérelle (F. d')— Le bactériophage et son comportement. 2ème. édition, 1926.
Hérelle et *Eliawa* — C. R. Soc. Biologie LXXXV:701.1921.
Koser (S.) — J. Inf. Diseases XLI(5):365.1927.
Twort — Lancet II:124.1915.




cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

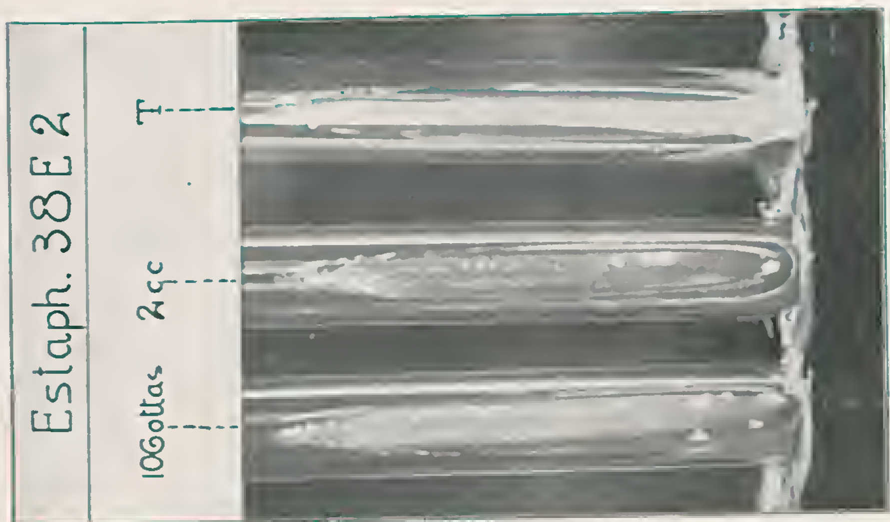
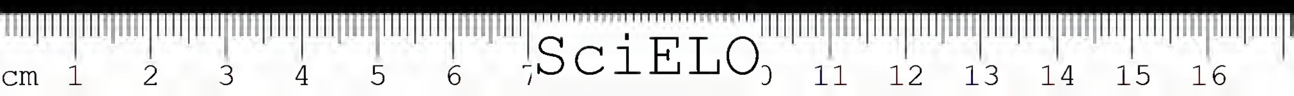


Fig. 4



Fig. 1


SciELO

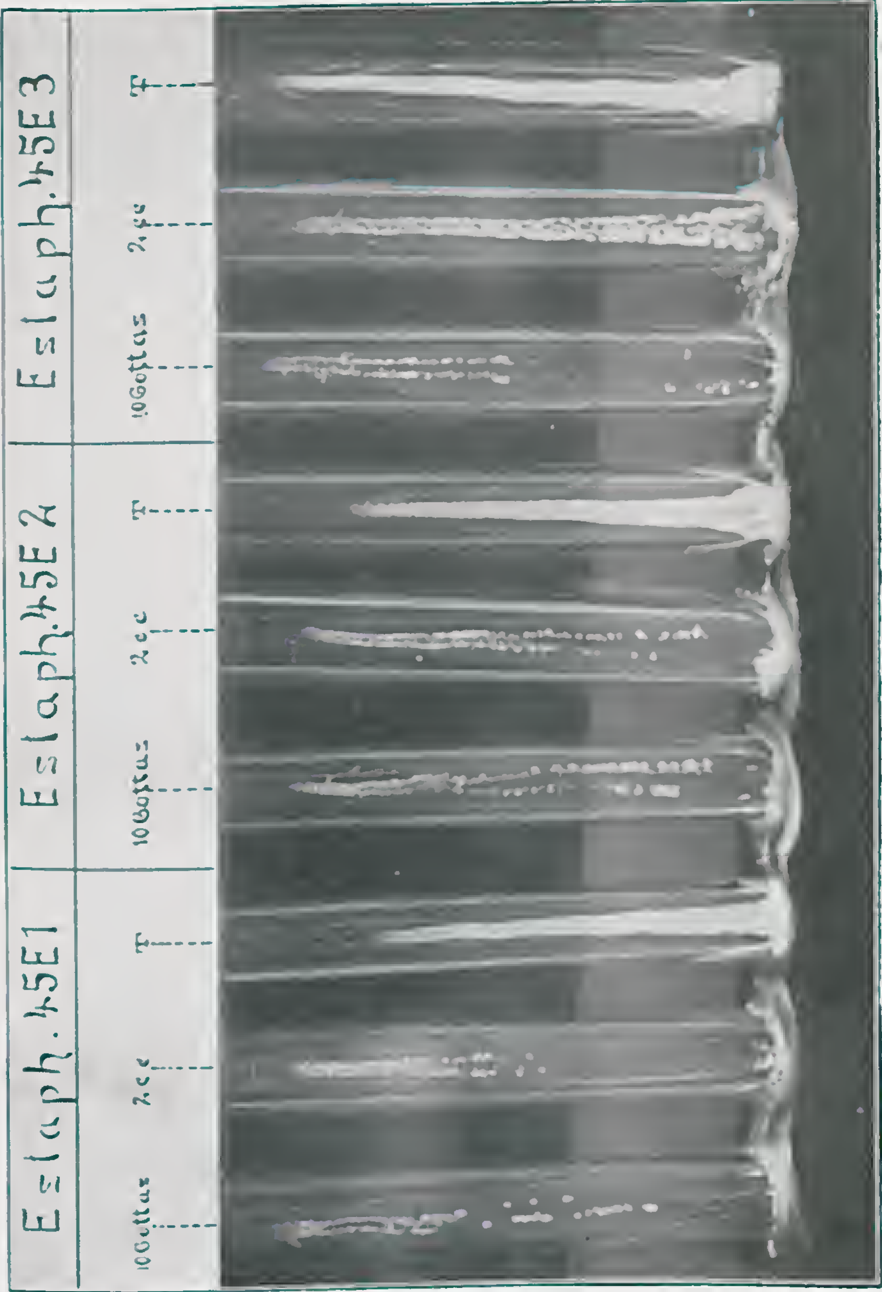
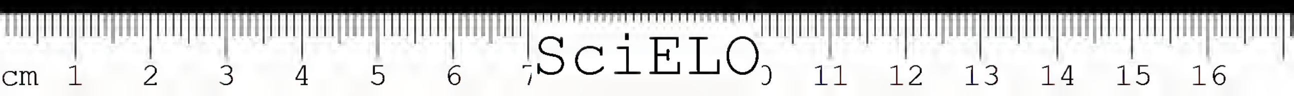

Eslaph.45E3
T
2cc
10Gottas
Eslaph.45E2
T
2cc
10Gottas
Eslaph.45E1
T
2cc
10Gottas

Fig. 2


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16

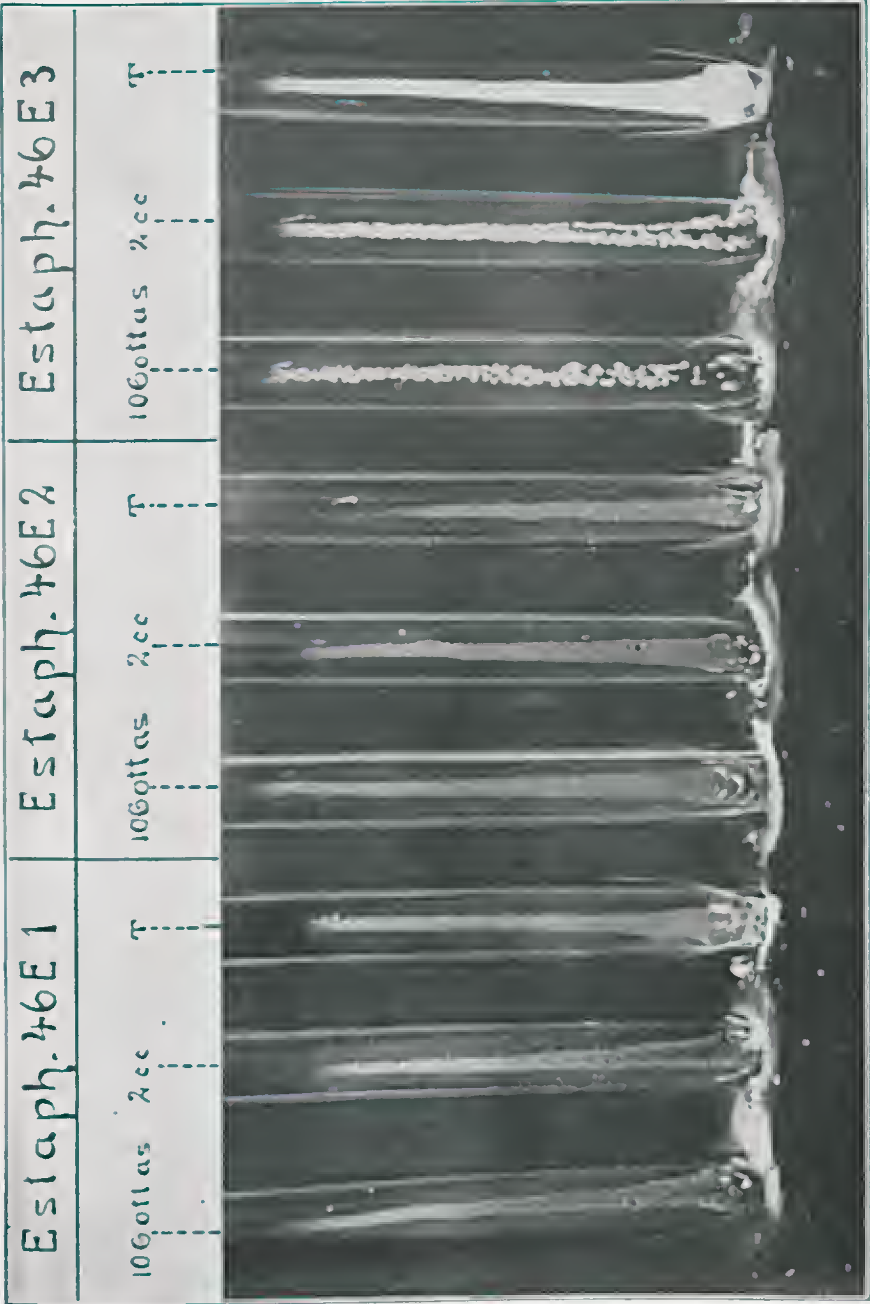
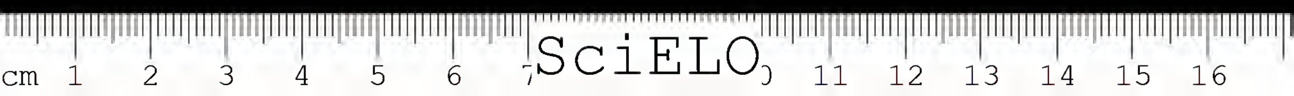

Estaph. 46E1
10 gottas
2 cc
T
Estaph. 46E2
10 gottas
2 cc
T
Estaph. 46E3
10 gottas
2 cc
T

Fig. 3


cm 1 2 3 4 5 6 7
SciELO
11 12 13 14 15 16

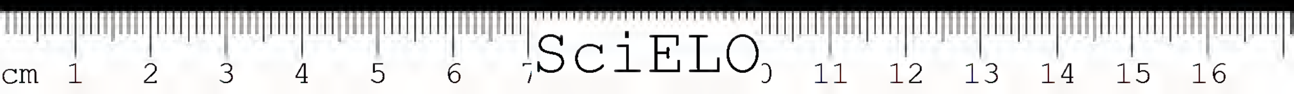
ESTUDOS SOBRE A FEBRE AMARELLA

MODERNOS CONHECIMENTOS SOBRE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL

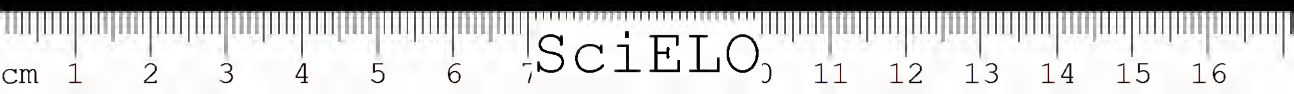
POR

J. LEMOS MONTEIRO

(Com 44 graphicos e 10 gravuras no texto)


SciELO

SUMMARIO


SciELO

ESTUDOS SOBRE A FEBRE AMARELLA

MODERNOS CONHECIMENTOS SOBRE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL

POR

J. LEMOS MONTEIRO

INTRODUCÇÃO

A protobiologia, assim podendo denominar-se o ramo da bacteriologia que estuda os virus chamados filtraveis, vem, nestes ultimos annos, alargando consideravelmente os seus horizontes.

Embora o conceito da filtrabilidade deva ser encarado de um modo relativo, grande tem sido o progresso obtido no conhecimento desses elementos filtraveis, responsaveis por numerosas infecções, tanto dos animaes, como dos vegetaes. Isto se deve ás contribuições surgidas em differentes paizes e que se iniciaram, principalmente, em 1908, depois dos trabalhos de Landsteiner e Popper sobre a poliomyelite, quando estes pesquisadores conseguiram infectar macacos com emulsão de medulla de um caso humano e demonstraram a natureza filtravel do virus; esses trabalhos foram confirmados mais tarde por Flexner e Lewis. Continuaram as contribuições sobre o assumpto com os trabalhos de Rous sobre o sarcoma da gallinha e sua natureza filtravel; os de Flexner e Noguchi ainda sobre a poliomyelite; os de Rocha Lima e os de Noguchi sobre a verruga peruana e febre de Oroya; os de Straus e Loewe e os de Levaditi, Harvier e Nicolau sobre a encephalite epidemica; os de McKinley e Holden, mostrando a identidade do virus da encephalite com o do herpes; os de d'Herelle, sobre o bacteriophago, dando origem a numerosas e valiosas contribuições, e, finalmente, culminaram em nossos dias, com os estudos de Stokes, Bauer e Hudson sobre a febre amarella.

Por todos estes trabalhos e outros que poderiam ser lembrados, assim como pelas contribuições a que deram origem, a technica do estudo dos virus vem-se aperfeiçoando sob o ponto de vista experimental. Grande numero de virus é já, com relativa facilidade, manejado e conservado nos laboratorios e, assim, são estudadas suas propriedades, sua pathogenicidade e as reacções que provoca em organismos sensiveis.

Embora a natureza destes protobios continue ainda no terreno das hypotheses, não devemos estar muito longe de vel-a elucidada, sendo possivel que então sejam modificadas muitas das nossas theorias fundamentaes da vida e da evolução (McKinley).

*

* *

No que diz respeito á febre amarella, o descobrimento do seu agente etiologico de ha muito vem pondo á prova a dedicação e perspicacia dos experimentadores.

Como causa do terrivel typho amarillico, tem sido incriminado grande numero de microorganismos, de natureza diversa, que, apenas por momentos, preoccuparam a attenção e interesse dos estudiosos.

Todos, desde o *Cryptococcus xanthogenicus*, de Domingos Freire, até a *Leptospira icteroides*, de Noguchi, têm tido vida ephemera, não podendo manter-se, deante de novos factos experimentaes, no pedestal a que foram elevados pelos seus descobridores e enthusiastas dos primeiros tempos.

Com a febre amarella é justo attribuir-se o facto, em grande parte, a não ter sido conhecido, até ha pouco, um animal de laboratorio sensivel ao mal e que, inoculado e infectado, revelasse lesões histo-pathologicas semelhantes ás que se encontram na doença humana.

Isto somente aconteceu em fins de 1927, quando Stokes, Bauer e Hudson, membros da commissão americana que estudava a febre amarella na Africa, publicaram os resultados das suas investigações. A estes scientistas devemos, não somente o conhecimento da sensibilidade de certos simios asiaticos (*Macacus rhesus* e *sinicus*) á infecção, quando inoculados com sangue de doentes ou picados por mosquitos (*Aëdes aegypti*) infectados, como tambem a demonstração da filtrabilidade do agente etiologico quando no sangue dos animaes infectados (*).

Já assignalámos em outra occasião que, na historia da febre amarella, os dois factos culminantes por suas consequencias praticas, foram a descoberta do agente transmissor da infecção e a de um animal de laboratorio sensivel ao virus.

A theoria da transmissibilidade da febre amarella por meio do mosquito, formulada em 1881, por Carlos J. Finlay, comprovada experimentalmente, alguns

---

(*) Este facto não diminue o valor dos trabalhos dos investigadores anteriores e principalmente os do mallogrado sabio japonez, os quaes tão justa repercussão alcançaram. Em publicação mais recente, Sawyer, Kitchen, Frobisher e Lloyd assignalaram, entre os casos diagnosticados como febre amarella na ultima epidemia do Rio de Janeiro, a presença da ictericia leptospirica (doença de Weil), comprovada pelo isolamento da *Leptospira* por Müller e Tilden, do sangue de dois doentes e pela demonstração que aquelles autores fizeram do poder protector do sôro de duas pessoas, positivo em relação á *Leptospira* e negativo em relação ao virus amarillico. A *Leptospira icteroides*, isolada por Noguchi, cuja identidade com a *Leptospira ictero-hemorrhagiae* é hoje geralmente acceita, não seria, segundo esses autores, um simples agente secundario no decurso da febre amarella, mas responsavel por uma forma de ictericia infectuosa

annos depois, por Walter Reed, James Carrol, Jesse Lazear e Aristide Agramonte, e já sustentada entre nós por E. Ribas, A. Lutz, P. Barreto e pela commissão do Instituto Pasteur, forneceu bases solidas e scientificas á verdadeira prophylaxia do mal, tornando possiveis e victoriosas as memoraveis campanhas de Gorgas, Emilio Ribas, Oswaldo Cruz e, ainda recentemente, a de Clementino Fraga.

O descobrimento feito por Stokes, Bauer e Hudson, da sensibilidade do macaco asiatico, *Macacus rhesus*, ao mal, collocou a febre amarella no dominio verdadeiramente experimental, trazendo-nos tambem a esperança de que seja completamente dominada em futuro não remoto.

* * *

A administração sanitaria do Estado, mantendo as suas tradições na defesa da saúde publica, facilitou ao Instituto Butantan todo o material e installações necessarias para que, durante o ultimo surto de febre amarella na Capital Federal, fosse o problema estudado entre nós, não só quanto ao seu lado pratico, relativo ao estudo e preparo da vaccina preventiva e do sôro curativo, como quanto ao seu aspecto scientifico, á luz dos recentes trabalhos da commissão americana na Africa.

Para este fim foram encommendados 100 exemplares de *Macacus rhesus*, cuja primeira remessa chegou ao Instituto em fevereiro de 1929.

Destes animaes, em virtude de mortes occorridas durante a viagem, ou por outros motivos, somente foram aproveitados 82. Posteriormente, em principios do corrente anno, recebemos uma nova partida de 25 macacos utilizaveis.

Os que estão familiarizados com os estudos experimentaes da febre amarella, hão de reconhecer quão reduzido é este numero de animaes para as pesquisas sobre tão importante problema, onde cada verificação nos apresenta novos aspectos, particularidades outras, carecedoras tambem de investigação e capazes de mostrar sem demora differentes faces a desafiar solução, sendo por isso necessarios abundantes animaes de experimentação e numerosos investigadores especializados.

(doença de Weil), muitas vezes fatal e cujo apparecimento pode coincidir com o da febre amarella typica, de que em geral não se distingue clinicamente.

Entre nós, Toledo Piza e L. Salles Gomes conseguiram diagnosticar a doença de Weil em dois casos, um dos quaes, considerado suspeito de febre amarella, teve o diagnostico confirmado retrospectivamente pela pesquisa da leptospira em material (rim) conservado da necropsia.

Assim sendo, as verificações de Noguchi passam a ter certa importancia epidemiologica, pois que, em futuras epidemias suspeitas de febre amarella, a existencia das duas formas de ictericia, uma devida ao virus da febre amarella e outra á *Leptospira*, deverá ser tomada em consideração, somente a primeira exigindo as medidas de prophylaxia em relação aos mosquitos.

Com o presente trabalho mostraremos os resultados experimentaes a que chegamos, estudando o problema sob alguns dos seus aspectos, com os *Macacus rhesus* importados pelo Instituto.

Faremos sobre os pontos de maior interesse uma resenha do que se conhece sobre a febre amarella experimental, encarada á luz das modernas acquisições, e mostraremos, de preferencia, os resultados e as deducções das nossas pesquisas pessoaes realizadas no Butantan e que, em parte, serviram de assumpto a trabalhos já publicados e de communicações á 4.ª Conferencia Sul-Americana de Microbiologia, Hygiene e Pathologia (reunida no Rio de Janeiro em julho de 1929), á Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo e á Sociedade de Biologia de S. Paulo.

No final indicaremos a bibliographia das principaes contribuições referentes á febre amarella, principalmente sob o ponto de vista experimental, além daquellas sobre as quaes fizemos referencias no decorrer do nosso trabalho, e isto com o intuito de servir aos estudiosos que se interessarem pelo problema.

Capitulo I

O virus da febre amarella

I - Animaes sensiveis á infecção

O trabalho fundamental, que assignala uma nova phase no estudo da febre amarella foi publicado em 28 de janeiro de 1928 no "Journal of the American Medical Association" por Stokes, Bauer e Hudson, sob o titulo "The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. Preliminary note". Pouco depois, em março, os mesmos autores publicam sobre seus estudos no "American Journal of Tropical Medicine", um trabalho mais pormenorizado e intitulado "Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals".

Estas contribuições, ao par do seu valor historico e scientifico e da importancia de suas consequencias praticas, nos trazem tambem á lembrança o nome de um dos seus autores, Adrian Stokes, morto de infecção amarillica, contrahida durante as experiencias em seu laboratorio, em Lagos. A sciencia e a humanidade deploram ainda a morte dos eminentes scientistas H. Noguchi, W. A. Young e P. A. Lewis, tambem victimados pela febre amarella, no decurso de trabalhos experimentaes.

Stokes, Bauer e Hudson, membros da Fundação Rockefeller, no desempenho de sua commissão para o estudo da febre amarella na Africa Occidental, iniciaram os trabalhos numa epidemia em Larteh, na Costa de Ouro.

Inocularam 6 *Macacus sinicus* (maio de 1927) com sangue de doentes. Cinco dos animaes tiveram febre e morreram e um não apresentou signaes de infecção.

Sub-inoculações foram praticadas em tres outros macacos da mesma especie, dos quaes dois tiveram apenas febre e o terceiro mostrou-se refractario.

Mais tarde (junho de 1927), fizeram experiencias com outro macaco asiatico, o *Macacus rhesus*, verificando que era muito sensivel. Um *rhesus*, inoculado com sangue de um caso benigno, morreu em 5 dias, mostrando-se positivas tambem as sub-inoculações. Conseguiram, com esta especie, 30 passagens da infecção de macaco a macaco pela inoculação do sangue ou do sôro. Com uma excepção apenas, a infecção foi sempre fatal. Ao mesmo tempo, 22 outros *rhesus* foram infectados, sendo transmittida a infecção de um a outro animal, por meio de picadas de *Aëdes aegypti*. Os mosquitos, depois de picarem os *rhesus* no 1.° ou 2.° dia de febre, tornavam-se infectantes em seguida a um certo periodo de incubação (que os autores verificaram não chegar até o 16.° dia) e assim permaneciam emquanto tinham vida.

Verificaram que o chimpanzé e outros macacos africanos, assim como as cobaias e outros animaes de laboratorio, eram refractarios á infecção.

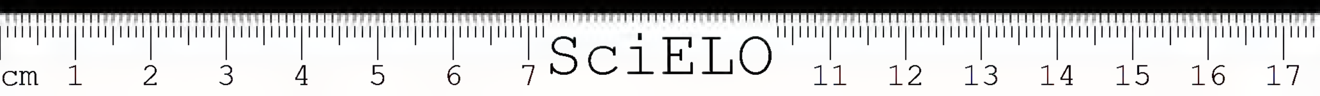
A primeira confirmação destes resultados experimentaes devemos a Mathis, Sellards e Laigret, que conseguiram transmittir a febre amarella ao *Macacus rhesus*, por meio da picada de um *Aëdes* infectado, ou pela inoculação de sangue de um caso benigno occorrido em Dakar, na pessoa de um syrio de 17 annos. O virus, assim isolado, foi mantido na Africa, por passagens de macaco a macaco, por Sellards e Hindle durante tres mezes e transportado á Europa.

A conferencia sobre a febre amarella reunida em Dakar (23 de abril a 1 de maio de 1928), sob a presidencia de Lasnet, encareceu, entre outros pontos importantes, a sensibilidade do *Macacus rhesus* á febre amarella.

Com o apparecimento dos primeiros casos de febre amarella no Rio de Janeiro, Henrique Aragão, do Instituto Oswaldo Cruz, apresentou, na sessão de 19 de junho de 1928, da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro, os primeiros resultados de suas verificações, confirmando os trabalhos americanos, mostrando a sensibilidade do *Macacus rhesus* ao virus responsavel pelo surto epidemico do Rio de Janeiro (virus americano) e verificando tambem a sensibilidade do *Macacus cynomolgus*.

Nestes primeiros ensaios, o pesquisador patricio inoculou tres *rhesus* com sangue de doentes: dois com sangue do 2.° para o 3.° dia e o terceiro com sangue do 3.° para o 4.° dia da infecção. Nenhum se infectou. Inoculou depois um *Macacus rhesus* e um *Macacus cynomolgus* com sangue de um caso benigno, colhido do 1.° para o 2.° dia da doença. Ambos morreram; o primeiro no 5.° dia e o outro no 7. dia após a inoculação. Os symptomas e as verificações histo-pathologicas confirmavam a infecção amarillica dos animaes, e eram semelhantes ás observadas na Africa.

Em relação ao virus americano, a sensibilidade do *Macacus rhesus* foi ainda confirmada entre nós por A. Marques da Cunha e Julio Muniz, no Rio; por N. C. Davis e A. W. Burke, na Bahia, e por nós, em S. Paulo.



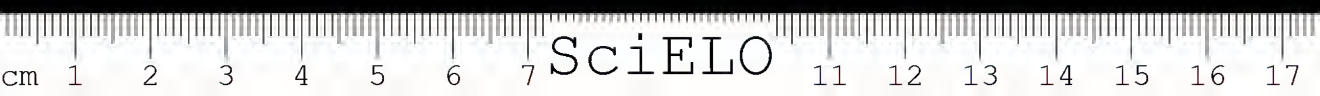
O virus responsavel pela febre amarella na Africa e representado por suas duas principaes amostras, isoladas respectivamente por Stokes, Bauer e Hudson e por Mathis, Sellards e Laigret, tem sido estudado, não só naquelle continente, como tambem na Europa e na America. A sensibilidade dos *rhesus* tem recebido confirmação, entre outros, com os trabalhos de A. W. Sellards e E. Hindle; A. Pettit, G. Stefanopoulo e C. Aguessy; A. Pettit, G. Stefanopoulo e C. Kolochine; E. Marchoux; J. E. Dinger; os dos experimentadores do Instituto Rockefeller, em Nova York e na Bahia; os de H. Aragão, Marques da Cunha e Julio Muniz, no Rio, e os nossos, em S. Paulo.

Consideram-se ainda sensiveis ao virus amarillico o *Macacus sinicus* e tambem, de accordo com novos trabalhos de Davis e Shannon, um simio sul-americano, o *Cebus macrocephalus*, embora os *rhesus*, pela sua maior sensibilidade, continuem a ser os animaes preferidos para os estudos experimentaes. Davis tambem conseguiu infectar o *Saimiri sciureus* com o virus amarillico, tanto pela inoculação de sangue, como pela picada de mosquitos infectados. Alguns dos animaes morrem e apresentam lesões, inclusive necrose hepatica, parecidas com as da infecção humana e experimental do *rhesus*. Verificou a possibilidade do virus passar tambem pelo *Ateleus ater*, embora não se verifique necrose no figado dos animaes sacrificados. Quanto ao *Lagothrix lagotrica*, de 12 exemplares estudados, somente 3 reagiram com elevação de temperatura á inoculação do virus. Apenas em um caso conseguiu transferir novamente o virus para o *rhesus*. Os sôros destes animaes experimentados manifestam uma acção protectora em relação ao virus amarillico.

Pesquisando a sensibilidade de quatro differentes especies de macacos africanos (*Cercopithecus tantalus*, *Cercocebus torquatus*, *Erythrocebus patas* e *Cercopithecus mora*), Bauer e Mahaffy verificaram que os animaes não succumbiam á infecção, embora pudessem conservar o virus durante um certo numero de dias, transmittindo-o mesmo aos mosquitos (conforme experiencias com os dois primeiros) que infectariam o *rhesus*, ou apenas pela inoculação do sangue como com o *Erythrocebus patas*. Com o *Cercopithecus mora* não conseguiram a reinfecção nem mesmo pela injecção de sangue.

Theiler publicou seus resultados experimentaes, segundo os quaes os camondongos brancos são susceptiveis ao virus da febre amarella, que pode ser transmittido indefinidamente do cerebro de um camondongo infectado a um camondongo normal. Confirmámos os trabalhos de Theiler sobre ser o virus amarillico neurotropico para o camondongo como relataremos, opportunamente, em capitulo especial.

Estudando a possibilidade de depositarios do virus amarillico entre os animaes domesticos, verificámos que gatos inoculados manifestam, ás vezes, symptomas pelos quaes se poderia crer na sua sensibilidade (reacção febril depois de certo periodo de incubação, tristeza, inappetencia, phenomenos de paresia, etc.), embora não succumbissem á infecção. Durante o periodo febril, o virus do gato poude ser transmittido ao *rhesus*, determinando neste uma typica infecção amarillica.



Embora não possamos ainda affirmar, com segurança, que os gatos sejam sensiveis ao virus, todavia procuraremos mostrar os resultados experimentaes obtidos sobre este caso particular, quando tratarmos especialmente dos depositarios de virus.

Os resultados que alcançámos com o gato, assim como os obtidos com o cão, mostram que, mesmo em animaes morphologicamente afastados do *Macacus*, o virus pode persistir durante um certo numero de dias, como acontece em generos mais proximos (*Cercopithecus, Cercocebus, Erythrocebus*), como vimos acima, á luz das observações de Bauer e Mahaffy.

Pelas verificações dos que trabalharam com os dois virus, africano e americano, é evidente, principalmente pelas experiencias de immunidade cruzada e pelas lesões histo-pathologicas observadas nos animaes, a identidade dos dois virus, embora se apresentem differenças no seu comportamento em relação á infecção experimental.

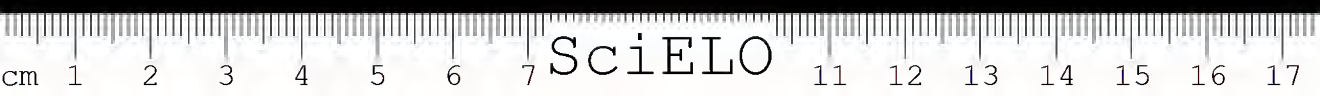
Faremos, por isto, um estudo separado do comportamento experimental desses virus, em relação ao *Macacus rhesus*, mostrando de preferencia os resultados da nossa observação pessoal.

II - Virus americano

E' esta denominação que se tem applicado ao virus responsavel pela febre amarella no Brasil, onde tem sido estudado com cuidado.

Como vimos, esse virus foi primeiro isolado e estudado por H. Aragão, que verificou ser menos pathogeno para o *Macacus rhesus* que o virus isolado na Africa. Aragão posteriormente inoculou sangue de 21 doentes de febre amarella em 26 *Macacus rhesus* e um *Macacus cynomolgus*. Cinco dos doentes já ultrapassavam as 72 horas da infecção e os resultados da inoculação foram negativos. Com os 16 macacos restantes os resultados foram variaveis: 4 tiveram infecção mortal, noutros a inoculação foi seguida de symptomas febris mais ou menos typicos, que os immunizaram em relação a posterior injecção do virus. Alguns succumbiram, quando injectados com a nova dose. Em um caso, o sangue colhido 36 horas após o inicio da febre de um doente (que falleceu) e injectado em macaco em 2 dias seguidos, causou a morte do animal, emquanto que o sangue colhido desse mesmo doente apenas depois de 10 horas do inicio da febre e inoculado noutro macaco, produziu somente oscillação febril atypica, de que resultou, em todo caso, immunidade em relação a nova inoculação do virus. As 4 infecções mortaes em macacos, foram devidas á injecção de sangue oriundo, em tres, de casos benignos e, numa somente, de um caso grave fatal.

Aragão verificou tambem a sensibilidade do *Macacus speciosus*, inoculado com emulsão de figado de um *rhesus* infectado com o virus americano e assignalou que a infecção experimental não é sempre mortal com este virus, que pode mais facilmente ser isolado de casos benignos da doença.



Marques da Cunha e Julio Muniz, estudando tambem o virus americano, fizeram verificações interessantes. Um *Macacus rhesus* que inocularam com sangue do 2.º dia de um caso benigno, morreu no fim de 12 dias, com symptomas e lesões histo-pathologicas typicas. Um segundo macaco, inoculado com material deste, foi sacrificado no 8.º dia, apresentando temperatura sub-normal e symptomas da infecção; pelo exame histo-pathologico, porém, não se verificou traço de necrose no figado, degeneração gordurosa ou infiltração polymorphonuclear. Outro, inoculado com material do segundo *rhesus*, apresentou de novo symptomas e lesões typicas.

Os autores fizeram 8 passagens, e assignalaram que, para se saber si o animal apresentava ou não febre, era necessario que se conhecesse previamente a temperatura normal de cada um, visto que esta apresenta grande variação individual. Observaram que *rhesus* inoculados com material que continha seguramente o virus, conforme verificação feita por meio de passagens, e sacrificados antes da queda final da temperatura, podiam não apresentar as lesões caracteristicas no figado, pelo que, muitas vezes, seria difficil reconhecer o virus brasileiro apenas pelo exame desse orgam. Notaram ainda estes autores o facto, por nós tambem verificado, de que a infecção apresentava algumas vezes uma incubação longa, de 10 dias, e que outras vezes os *rhesus* succumbiam sem apresentar nenhuma elevação da temperatura.

Davis e Burke, estudando o virus americano, na Bahia, accentuaram que elle exigia o cuidado especial de manutenção por passagens de macaco a macaco, necessitando-se para isto de abundancia de animaes.

Este comportamento do virus americano, sua menor pathogenicidade para o *Macacus rhesus* em relação ao virus africano e a evolução atypica que ás vezes determina, pudemos verificar com a amostra que conseguimos isolar em S. Paulo, de um doente vindo do Rio de Janeiro já em periodo de incubação do mal, e internado para observação no Hospital do Isolamento, onde teve o 1.º dia de febre, podendo assim ser acompanhado durante toda a evolução.

Parte experimental.

O caso assim estudado foi o de um hungaro que viera de um fóco então existente no Rio de Janeiro, acompanhando uma sua irmã doente que depois falleceu de febre amarella no Hospital do Isolamento desta Capital.

Foi elle internado, para observação e para os effeitos de vigilancia, no dia 1-11-1929.

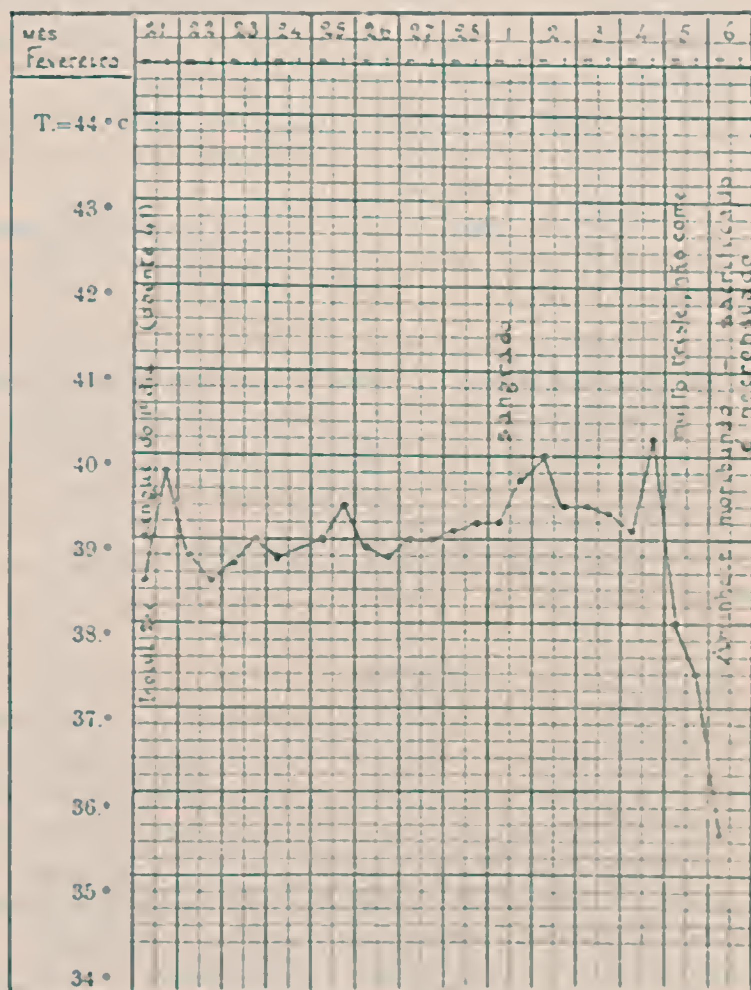
Tratava-se do doente n.º 41, I. C., de 40 annos, branco. Nos dois primeiros dias de observação no hospital apresentou temperatura e pulso normaes. Em 3-11-1929, pela madrugada a temperatura se elevou, continuando a infecção clinicamente caracteristica e fallecendo o doente na manhã de 12-11-1929.

O sangue deste doente, colhido no 1.º dia da febre, foi-nos immediatamente remettido pelo medico interno do hospital, dr. J. de Toledo Piza, e conservado em nosso laboratorio num frigo "Nizer" na temperatura 8°C. abaixo de 0.

Esteve assim congelado durante 18 dias até a chegada dos nossos primeiros *Macacus rhesus* (Fig. 1).

Recebemos diariamente sangue deste doente, sendo que com o colhido nos tres primeiros dias de febre foram inoculados os macacos, cujas observações são em seguida resumidas:

Macacus rhesus N.º 1
(1929)



Graphico 1

1.º - *Macacus rhesus* 1. Inoculado com 2 cc. de sangue, via sub-cutanea, do 1.º dia do doente 41, em 21-II-1929.

O graphico 1 mostra a evolução da infecção deste macaco: depois de 8 dias, a temperatura attingiu 40°, voltando ao normal no dia seguinte, e apresentando,

consecutivamente, ascensão para 40°.2 e queda brusca, até que, em 6-III-29, amanheceu com a temperatura de 35°.5 e com os symptomas da infecção amarillica experimental (Fig. 2). Na manhã desse dia, o animal foi sacrificado, 13 dias depois da inoculação.

A verificação histo-pathologica confirmou a infecção.

Uma emulsão de figado foi inoculada no *rhesus* 8.

2.° - *Macacus rhesus* 2. Inoculado por via peritoneal em 21-II-1929 com 1 cc. de sangue do 1.° dia do mesmo doente. Durante muitos dias de observação, o *rhesus* não denotou symptomas typicos, embora, em certos dias, sua temperatura tivesse attingido 40°, parecendo pois, ter resistido á infecção.

Em 27-III-1929 foi inoculado com o virus africano activo (2 cc. de sangue do *rhesus* 9), tendo resistido tambem a esta inoculação, conforme se evidenciou durante um longo periodo de observação.

O *rhesus* 2, embora não tenha tido uma infecção mortal como consequencia da inoculação do sangue do doente, mostrou-se immunizado em relação a nova inoculação do virus africano.

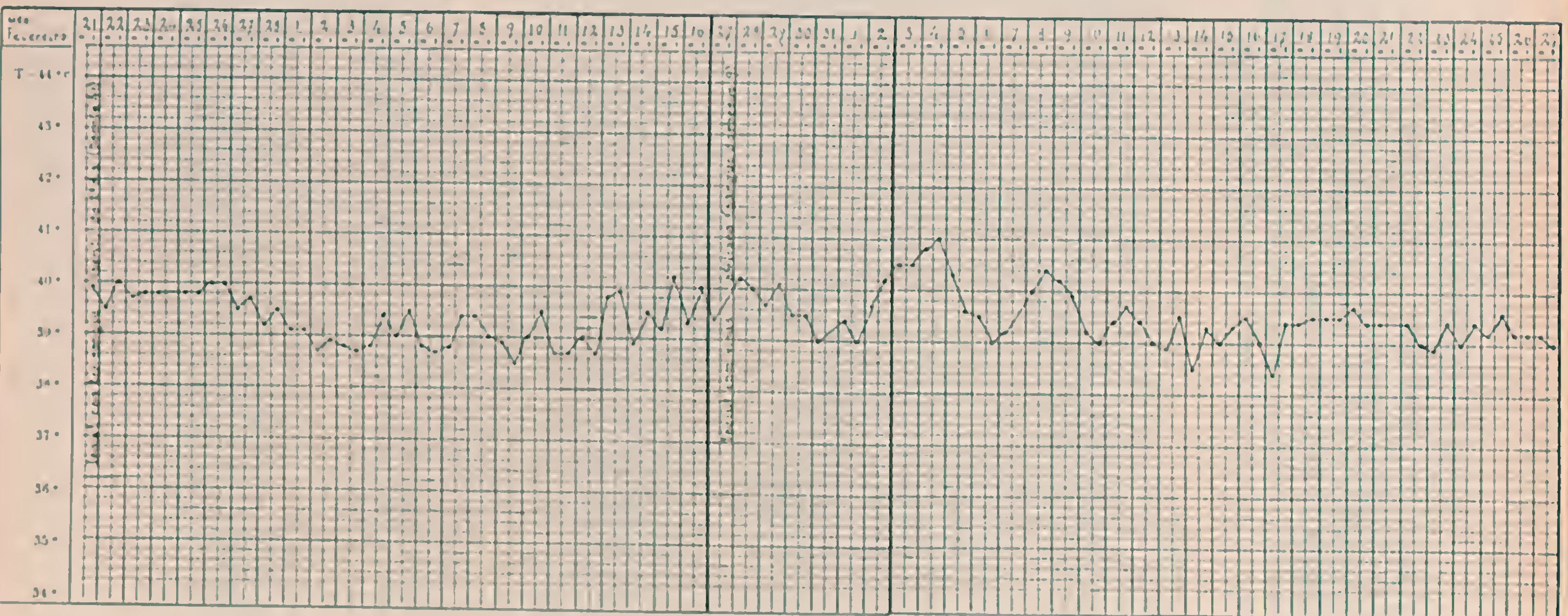
3.° - *Macacus rhesus* 3. Inoculado em 21-II-1929 com 2 cc. de sangue, injecção subcutanea, do 2.° dia de febre do mesmo doente. Não apresentou symptomas clinicos que denunciassem a infecção, pelo que em 27-III-1929 foi inoculado com o virus africano (2 cc. de sangue do *rhesus* 9). Como consequencia desta 2.ª inoculação, verificou-se uma infecção caracteristica, de que resultou a morte do *rhesus* no 7.° dia.

Assim, pois, a inoculação primitiva não determinou infecção, nem mesmo ligeira como no *rhesus* 2, nem a consequente immunidade em relação ao virus africano.

4.° - *Macacus rhesus* 4. Inoculado em 21-II-1929, por via peritoneal, com 2 cc. de sangue, colhido no 2.° dia de febre do mesmo doente, não apresentou reacção febril ou signaes clinicos caracteristicos; em 27-III-1929 foi inoculado com o virus africano (2 cc. de sangue do *rhesus* 9). Como consequencia desta inoculação o *rhesus* apresentou, 6 dias depois, reacção febril, que perdurou durante tres dias, para voltar á media normal, resistindo o animal durante uma observação de varios meses. O graphico 2, mostra a curva thermica deste *rhesus* como consequencia das inoculações recebidas, até depois do primeiro mês de observação.

5.° - *Macacus rhesus* 5. Inoculado em 1-III-1929 com 3 cc. de sangue do 3.° dia addicionado com o restante de sangue dos 1.° e 2.° dias de febre do mesmo doente. O sangue dos 3 primeiros dias, pois, foi misturado em 10 cc. de agua physiologica e inoculado no peritoneo do macaco.

A temperatura do *rhesus* attingiu algumas vezes a 40° mas não mostrou a curva caracteristica da infecção. No fim de 22 dias da inoculação apresentou-se triste, com symptomas que faziam suspeitar a infecção e a temperatura começou



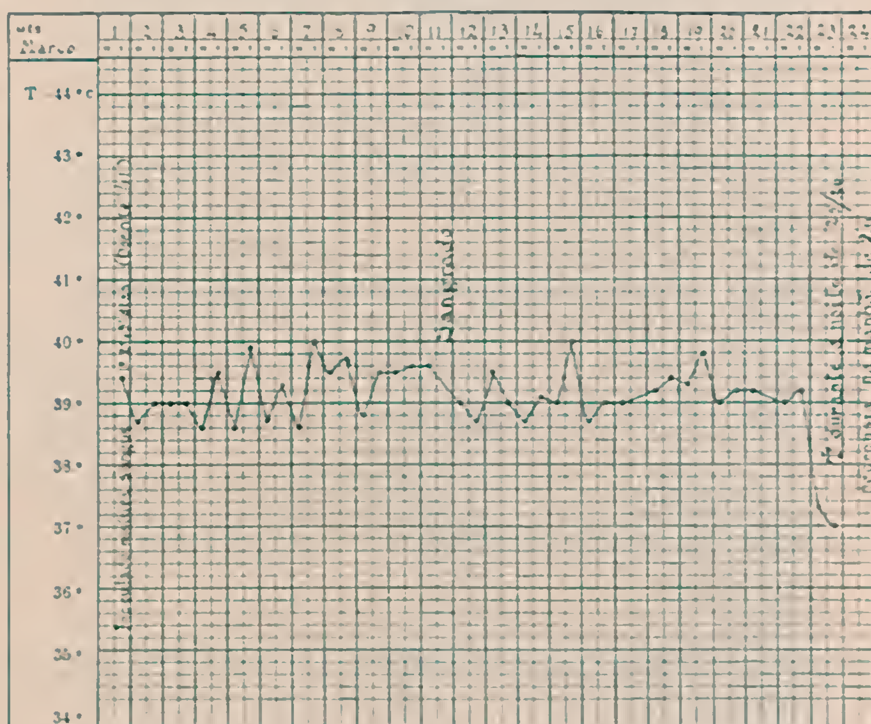
Graphico 2

a descer (graphico 3). Amanheceu morto na gaiola na noite de 25 para 26-III-1929, ou 25 dias depois da inoculação.

Pela necropsia, os organs (figado principalmente) apresentam o aspecto que se costuma observar na infecção experimental.

6.° - *Macacus rhesus* 8. Inoculado em 7-III-1929 com emulsão de figado do *Macacus rhesus* 1, para nova passagem do virus americano (S. Paulo).

Macacus rhesus N.° 5
(1929)



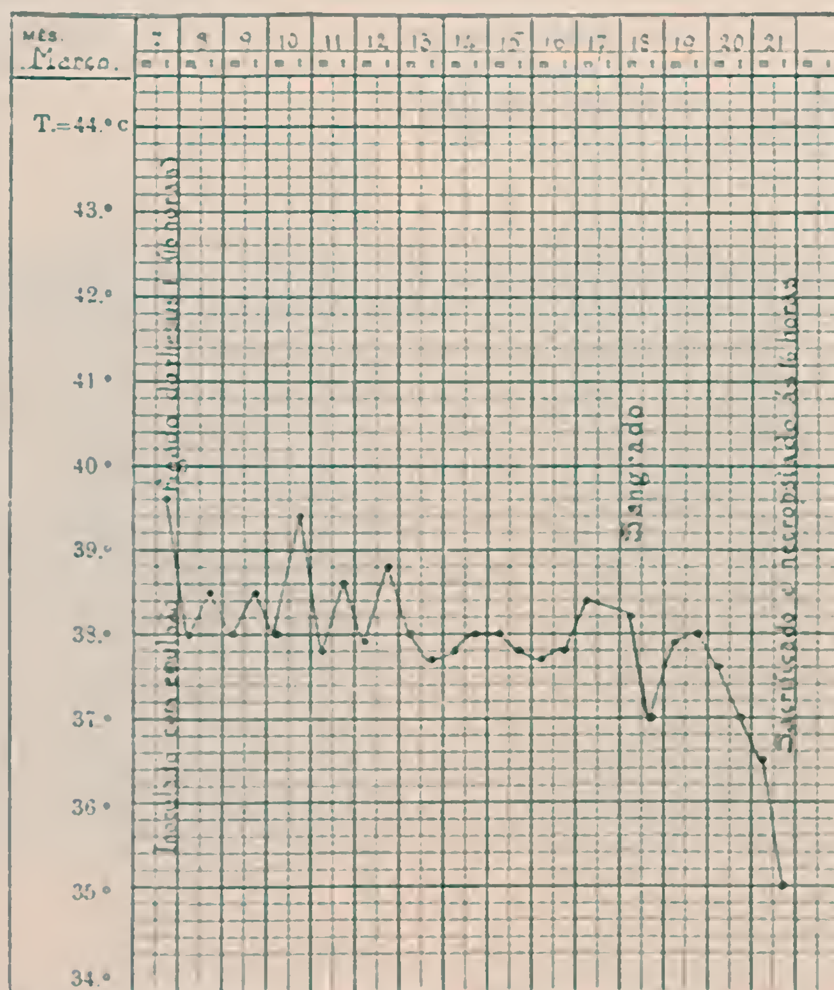
Graphico 3

Ao ser inoculado o *rhesus*, em virtude de se ter debatido muito para a captura, apresentou 39°,6. No dia seguinte a temperatura foi de 38° e 38°,5, assim se mantendo no 3.° dia; no 4.° dia, á tarde, subiu a 39°,4, depois desceu e se manteve em media normal ou pouco abaixo. Em 18-III-1929 desceu a 37° para se elevar no dia seguinte a 38°; em 20-III-1929 começou a descer, accentuando-se esse declinio em 21-III-1929, quando chegou a 35° á tarde (graphico 4), apresentando o animal os symptomas caracteristicos da infecção. Estava então triste, não se alimentando e mal podendo supportar-se em pé. Este estado accentuou-se (Fig. 3), sendo o animal sacrificado e necropsiado. Pela necropsia se verificou

o aspecto semelhante ao observado na infecção experimental, o que foi confirmado pelo exame histo-pathologico.

Um pedaço de figado deste animal foi emulsionado e inoculado no *rhesus* 14 para nova passagem do nosso virus.

Macacus rhesus N.° 8
(1929)



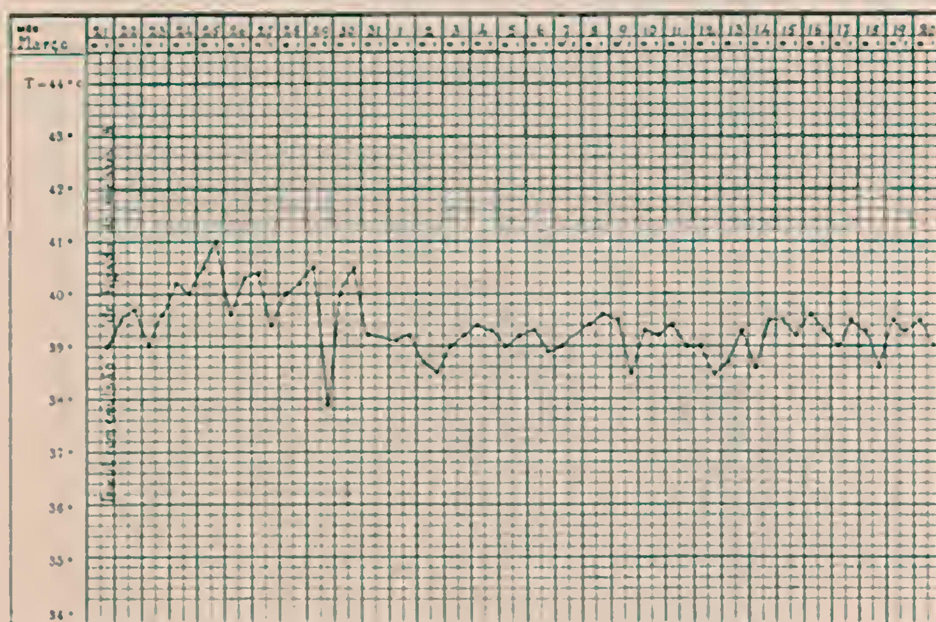
Graphico 4

7.° - *Macacus rhesus* 14. Inoculado em 21-III-1929 com emulsão de figado do *rhesus* 8. No 3.° dia após a inoculação, a temperatura subiu além de 40°, attingindo 41° na tarde do dia immediato. Manteve-se em asçensão alguns dias, com oscillações tendentes a voltar dias após á media mais ou menos normal, como se vê no graphico 5, tomado durante um mês de observação.

No fim de mais de 2 meses, mantendo-se a temperatura sempre na media normal, o macaco foi inoculado, em 30-V-1929, com o virus africano. Como consequencia desta inoculação, a temperatura não se alterou da media normal, resistindo o animal e mostrando-se, pois, immunizado em relação a este virus activo.

Em virtude deste comportamento do virus americano, que estudámos, resolvémos não insistir nas passagens em macacos, visto não ser muito elevado o numero dos que podiamos dispôr, necessarios para outras pesquisas que tinhamos em vista realizar com o virus africano, para o qual os *rhesus* se mostravam mais sensiveis. Isto estava de accordo com as observações feitas no Rio de Janeiro e na Bahia, em virus isolados nesses logares.

Macacus rhesus N.° 14
(1929)



Graphico 5

III - Virus africano

Foi isolado pela primeira vez por Stokes, Bauer e Hudson e depois por Mathis, Sellards e Laigret, constituindo essas duas amostras as principaes com que se vem realizando a grande maioria dos estudos experimentaes a respeito da febre amarella.

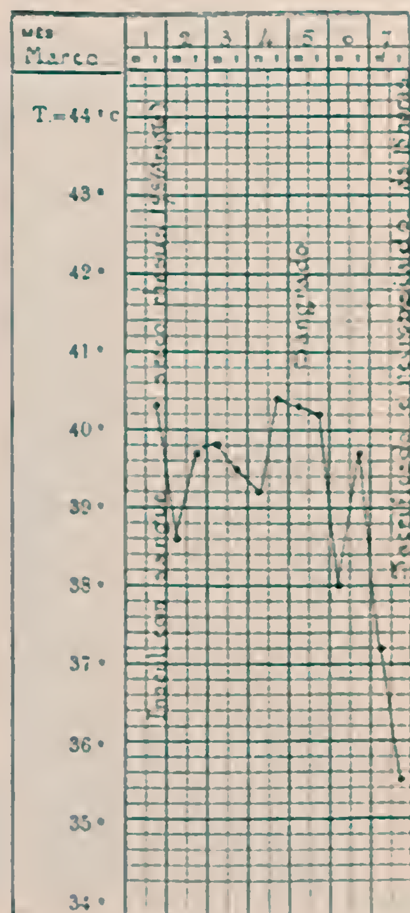
O comportamento experimental destas duas amostras é identico: vêm sendo mantidas, por passagens successivas de macaco a macaco, nos differentes laboratorios que se têm occupado do assumpto. Como é sabido, o virus (sangue ou

figado), secco e mantido em certas condições, retem sua actividade por varios meses e assim o seu estudo e conservação se tornam mais faceis e economicos.

Em relação á virulencia do virus, não se observa uma relação entre a infecção humana e a do macaco.

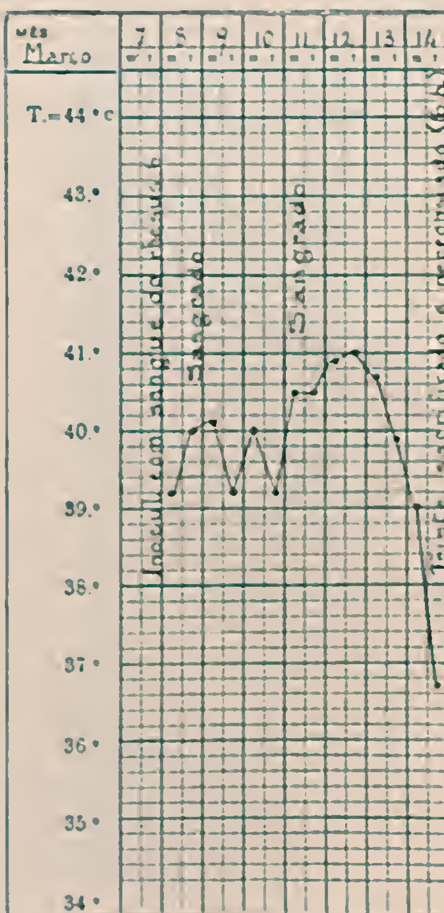
O virus africano, que se mostra tão infectante para o macaco, foi isolado de um caso benigno de infecção humana; o mesmo facto verificou Aragão em relação ao virus americano.

Macacus rhesus N.º 6
(1929)



Graphico 6

Macacus rhesus N.º 9
(1929)



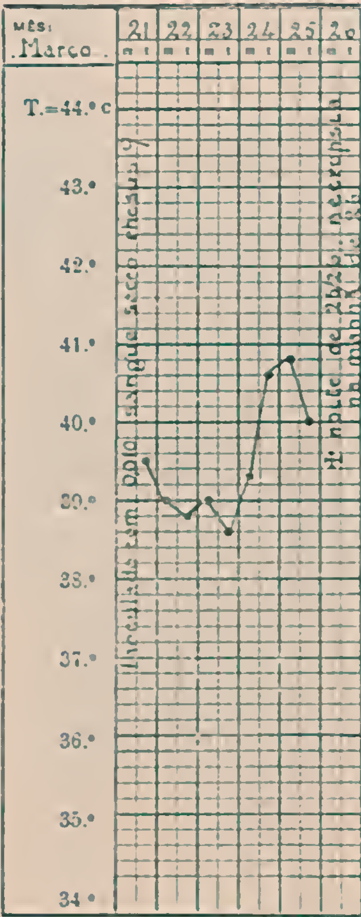
Graphico 7

A D.M.M. do virus, no sangue ou no figado dos *rhesus* infectados, varia sob a influencia de causas numerosas, ainda não perfeitamente estabelecidas, entre as quaes sobresae a questão da receptividade, condicionada por factores individuaes. Stokes, Bauer e Hudson conseguiram infectar macacos com 0,00001 cc.

de sangue e, em algumas experiencias, Hindle obteve infecção com 0,000001 gr. de figado infectante.

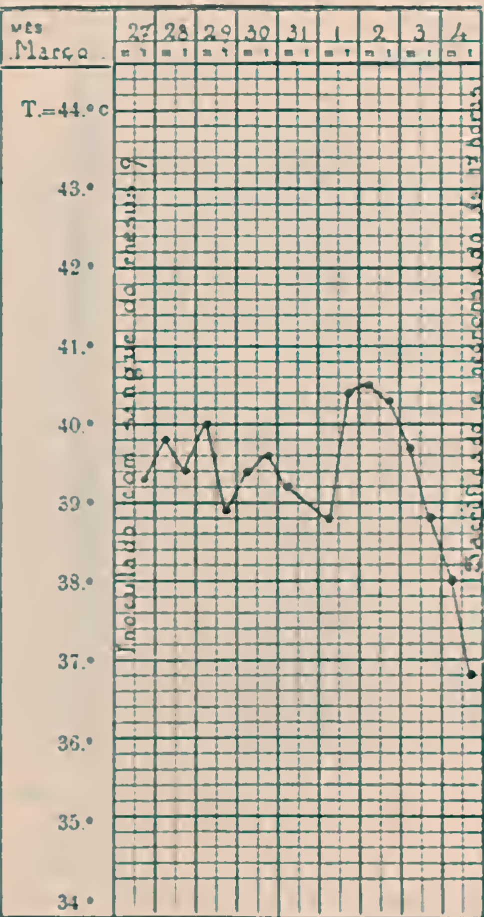
A marcha seguida pela infecção resultante das amostras do virus africano já é bem conhecida; a inoculação dellas no macaco *rhesus* determina a infecção em prazos mais ou menos longos, e apresenta a caracteristica evolução clinica. Assim é que se observa geralmente, após a inoculação, um periodo de incubação que dura de 2 a 6 dias, quando a temperatura sóbe além de 40°, permanece ele-

Macacus rhesus N.° 12
(1929)



Graphico 8

Macacus rhesus N.° 16
(1929)



Graphico 9

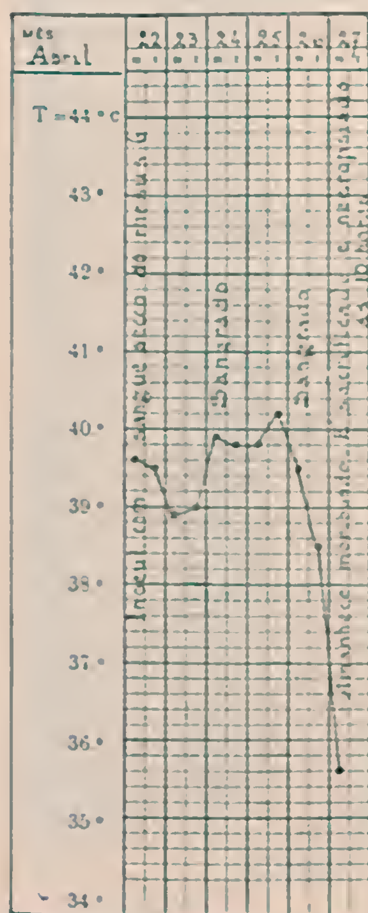
vada entre 1 e 4 dias, cahindo depois bruscamente. Occorrem então o collapso e a morte do animal. Quando elle resiste á infecção, restabelecendo-se, a temperatura, em vez de declinar para a sub-normal, desce apenas até a media normal e ahi se mantém.

Mostraremos, a seguir, os resultados das inoculações feitas por nós com o virus africano, e que melhor poderão ser verificados pelos graphicos inclusos neste trabalho.

Parte experimental.

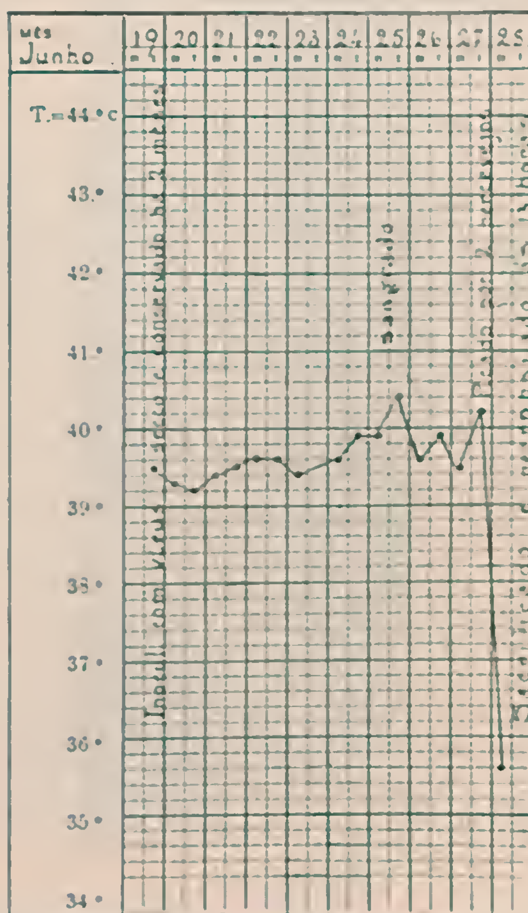
A amostra que estudámos, da raça Asibi, isolada em Lagos, Nigeria, é proveniente do Instituto Rockefeller de Nova York e foi-nos cedida pelo dr. Henrique

Macacus rhesus N.° 26
(1929)



Graphico 10

Macacus rhesus N.° 38
(1929)



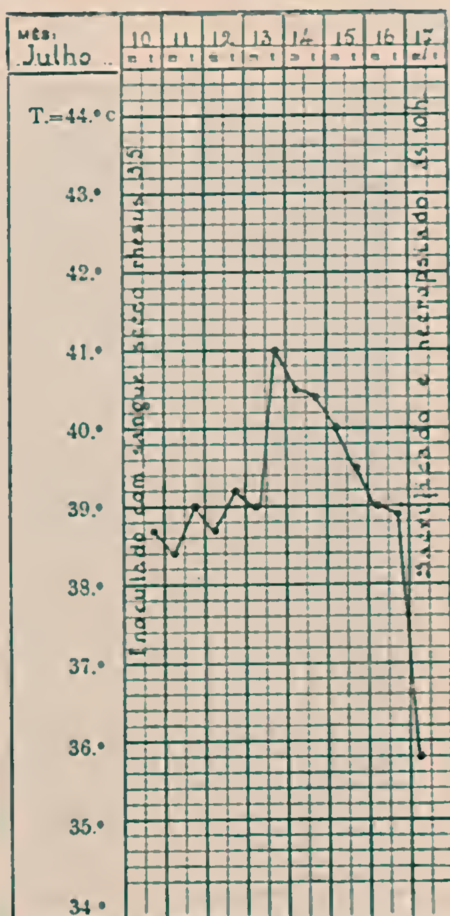
Graphico 11

Aragão, do Instituto Oswaldo Cruz. O material que nos forneceu este distincto mestre e amigo consistiu em sangue e figado seccos, conservados no vacuo, em baixa temperatura, e por elle colhidos do seu *rhesus* 198. Posteriormente, delle obtivemos sangue secco proveniente do seu *rhesus* 373.

No nosso laboratorio o primeiro material foi mantido a -8°C. No fim de 107 dias de sua colheita, o tubo que continha o sangue foi aberto e o material, depois de convenientemente diluido, inoculado num *rhesus*.

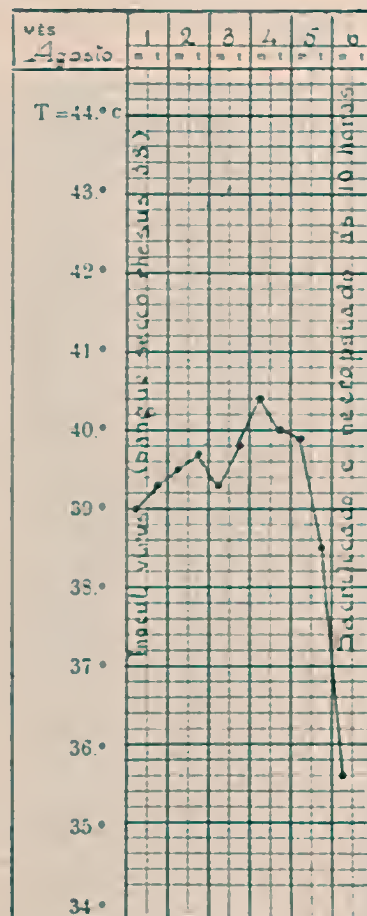
As experiencias seguintes mostram as differentes passagens que realizámos com este virus, e os seus resultados experimentaes em condições differentes.

Macacus rhesus N.° 44
(1929)



Graphico 12

Macacus rhesus N.° 62
(1929)



Graphico 13

1.° - *Macacus rhesus* 6. Inoculado em 1-III-1929 com sangue secco diluido do *rhesus* 198 (Aragão) depois de 107 dias de conservação no vacuo e em baixa temperatura.

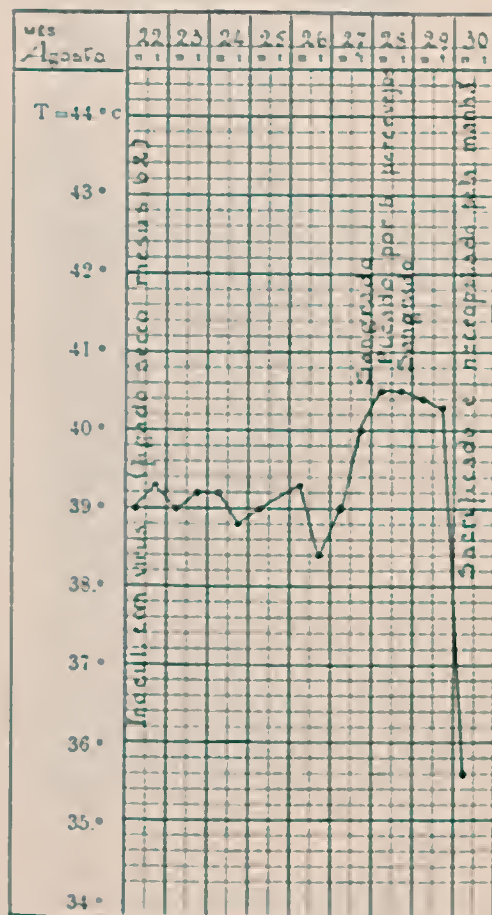
Teve uma infecção clinicamente caracteristica (graphico 6 e fig. 4) e morreu no fim de 6 dias. A necropsia revelou o aspecto commummente encontrado na infecção experimental e o estudo histo-pathologico confirmou-a.

2.° - *Macacus rhesus* 9. Inoculado em 7-III-1929, no peritonio, com 2 cc. de sangue do *rhesus* 6, colhido do coração durante a necropsia.

Evolução typica da infecção (graphico 7 e fig. 5) e morte no fim de 7 dias.

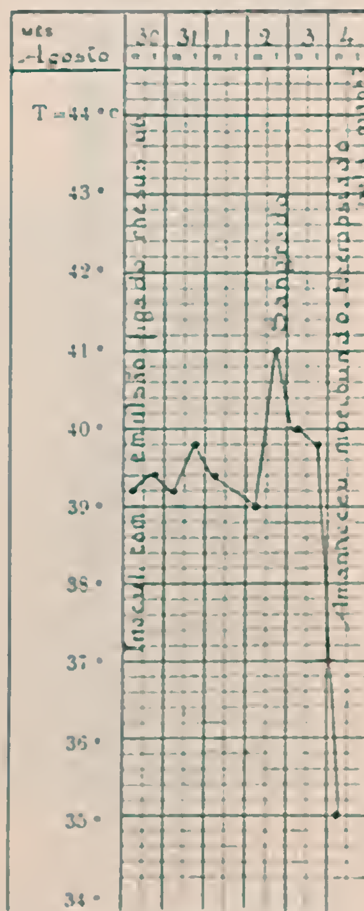
3.° - *Macacus rhesus* 12. Inoculado em 21-III-1929 com 0,01 gr. de sangue secco do *rhesus* 9, colhido no 4.° dia da infecção deste.

Macacus rhesus N.° 66
(1929)



Graphico 14

Macacus rhesus N.° 69
(1929)



Graphico 15

Evolução typica da infecção (graphico 8) e morte durante a noite do 4.° para o 5.° dia.

4.° - *Macacus rhesus* 16. Inoculado em 27-III-1929 com 2 cc. de sangue do *rhesus* 9, depois de ter permanecido em congelação durante 13 dias.

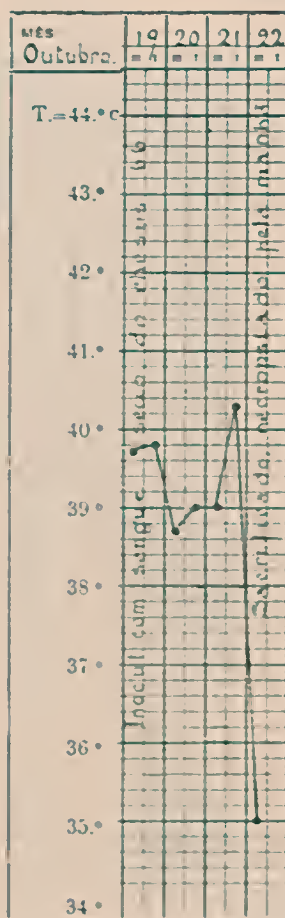
Evolução caracteristica (graphico 9) e morte em 8 dias.

5.° - *Macacus rhesus* 26. Inoculado em 22-IV-1929, no peritonio, com sangue secco diluido do *rhesus* 6, colhido no 2.° dia da reacção febril.

Evolução typica da infecção (graphico 10) e morte em 5 dias.

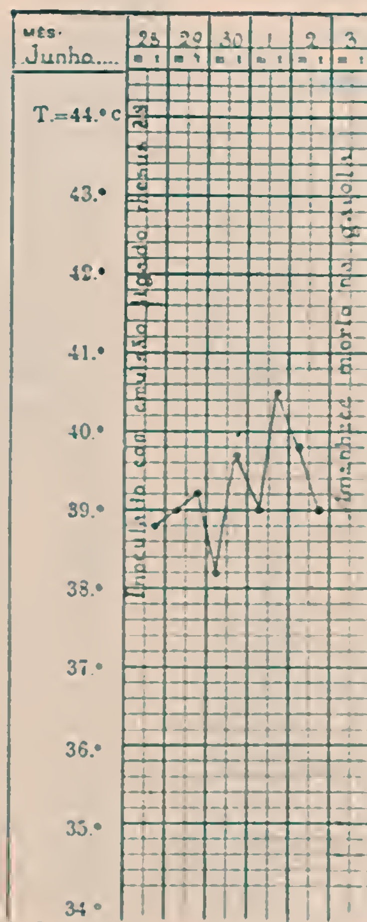
6.° - *Macacus rhesus* 38. Inoculado em 19-VI-1929 com o virus secco e conservado ha 2 meses.

Macacus rhesus N.° 80
(1929)



Graphico 16

Macacus rhesus N.° 40
(1929)



Graphico 17

Evolução caracteristica da infecção e morte em 9 dias (graphico 11).

7.° - *Macacus rhesus* 44. Inoculado em 10-VII-1929 com sangue secco diluido do *rhesus* 35, que resistiu á infecção, sendo o sangue colhido no 2.° dia de reacção febril e 4.° da inoculação.

Evolução caracteristica da infecção (graphico 12 e figs. 6 e 7) e morte em 7 dias.

8.° - *Macacus rhesus* 62. Inoculado no peritonio em 1-VIII-1929 com sangue secco do *rhesus* 38 (colhido em 25-VI-1929).

O graphico 13 mostra a curva da infecção deste *rhesus*, que morreu em 5 dias.

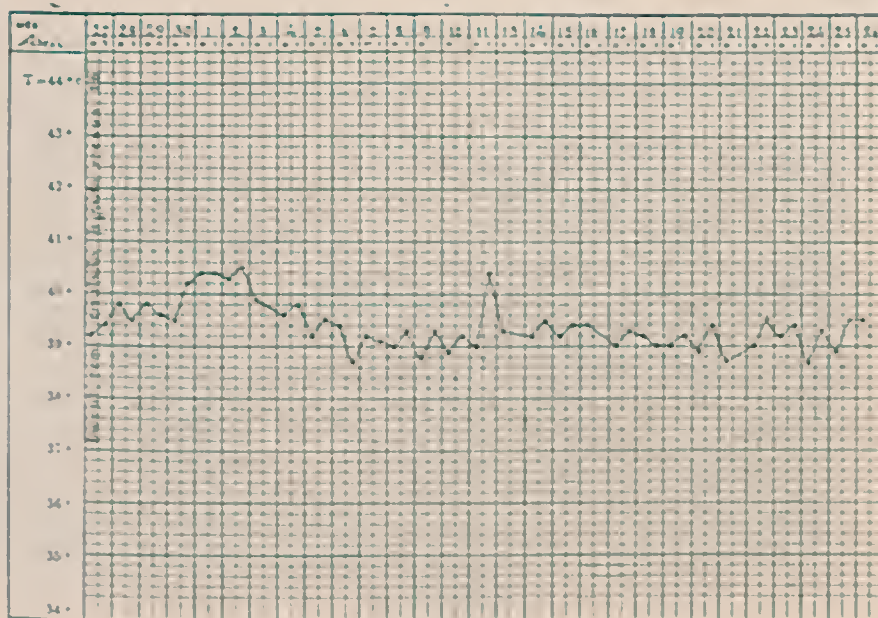
9.° - *Macacus rhesus* 66. Inoculado no peritonio, em 22-VIII-1929, com emulsão de figado secco do *rhesus* 62, colhido em 6-VIII-1929.

Evolução caracteristica da infecção (graphico 14) e morte em 8 dias.

10.° - *Macacus rhesus* 69. Inoculado no peritonio, em 30-VIII-1929, com emulsão de figado fresco do *rhesus* 66.

Evolução caracteristica da infecção (graphico 15) e morte em 5 dias.

Macacus rhesus N.° 27
(1929)



Graphico 18

11.° - *Macacus rhesus* 80. Inoculado em 19-X-1929, no peritonio, com sangue secco diluido do rhesus 66, colhido no 1.° e 2.° dias de reacção febril, em 27 e 28-VIII-29.

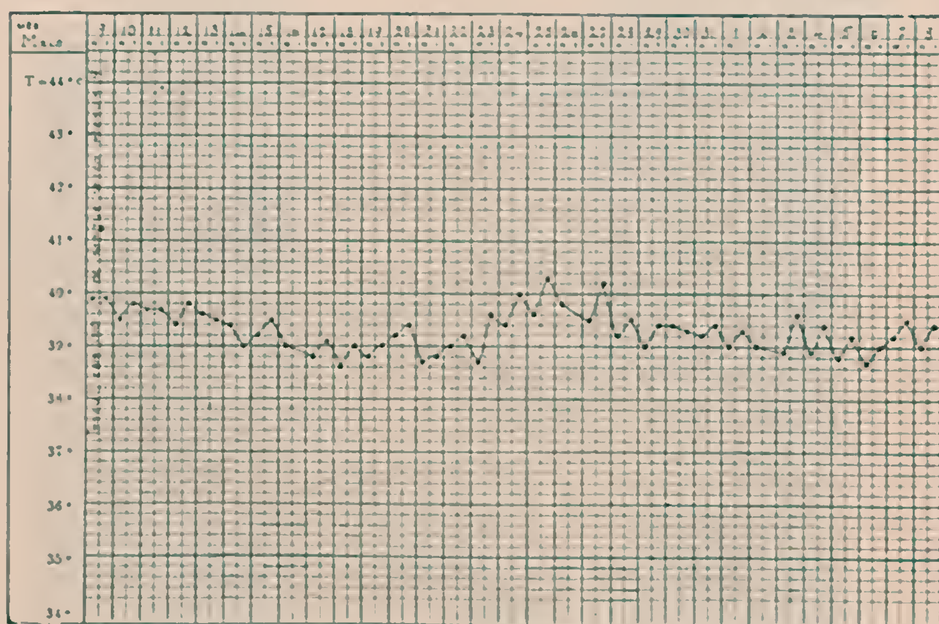
Evolução rapida da infecção, por ter sido elevada a dose, visto o animal ser de grande porte. O graphico 16 mostra esta evolução. Morte em 3 dias.

12.° - *Macacus rhesus* 40. Inoculado em 28-VI-1929, por via sub-cutanea, com emulsão de figado fresco do *rhesus* 38. O graphico 17 mostra a curva thermica do animal, que amanheceu morto na gaiola no 5.° dia depois da inoculação.

Nos casos assignalados a infecção teve sempre evolução fatal, confirmada pela necropsia e pelos exames histopathologicos feitos no nosso laboratorio pelo dr. J. B. Arantes.

Verificámos que, mesmo com o virus africano e em certas circunstancias, a infecção pode não ser fatal. O animal apresenta reacção febril caracteristica e, no fim de alguns dias, a temperatura, em vez de cahir para a sub-normal, mantem-se na media normal. Outras vezes não se observa a reacção febril e o animal nada apresenta de anormal. Em todos estes casos, porém, a inoculação posterior do virus fresco, seguramente activo, fica sem effeito, o que mostra a resistencia adquirida pelo animal em virtude da primeira inoculação. Sem duvida,

Macacus rhesus N.° 32
(1929)

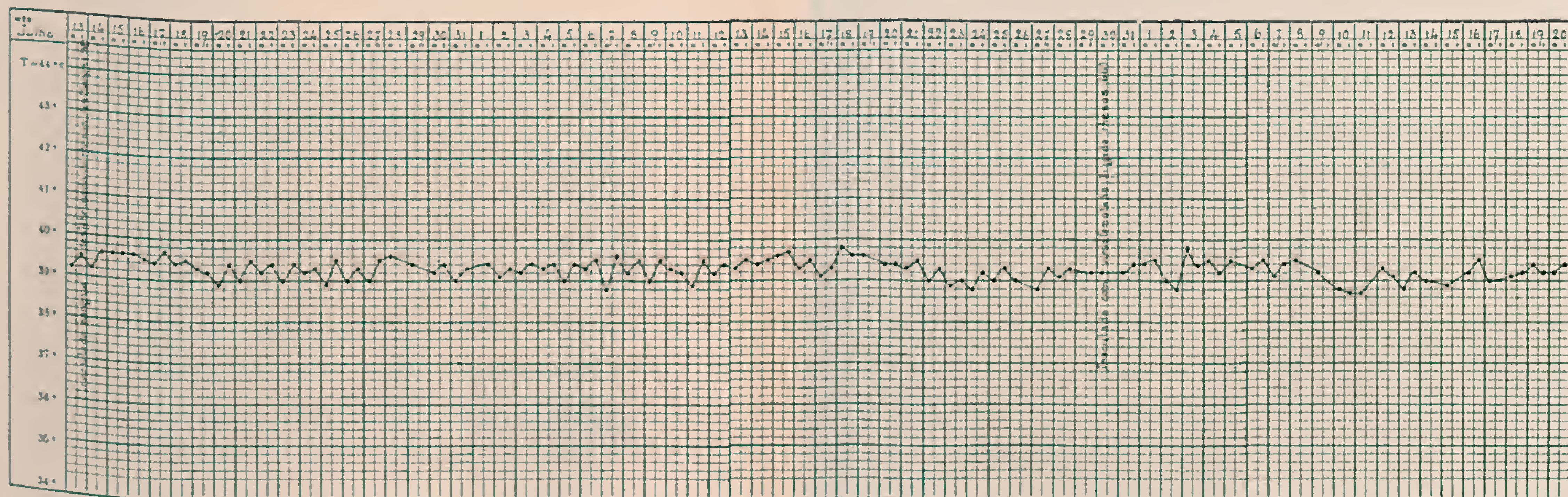


Graphico 19

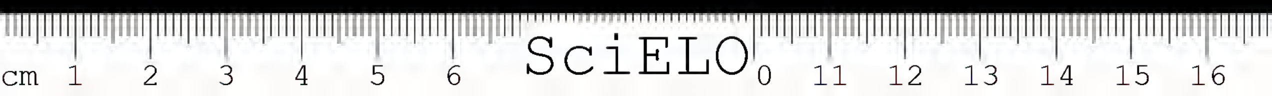
este phenomeno de immunidade deve decorrer do poder antigenico da primeira injecção que fora apenas capaz de determinar uma infecção ligeira, clinicamente inapparente. Este facto foi observado com os seguintes ensaios:

13.° - *Macacus rhesus* 13. Inoculado em 21-III-1929 com figado secco do *rhesus* 198 (Aragão), colhido em 12-XI-1928. O macaco apresentou reacção pouco accentuada e restabeleceu-se. E' provavel que tenha havido attenuação grande do virus depois deste prazo de mais de 4 mezes, pois, segundo vimos, o mesmo com 107 dias se mostrou muito activo (experiencia 1.ª, *rhesus* 6). Em 4-V-1929, foi inoculado com o virus africano fresco e resistiu á infecção, mostrando-se pois immunizado.

Macacus rhesus N.º 46
(1929)



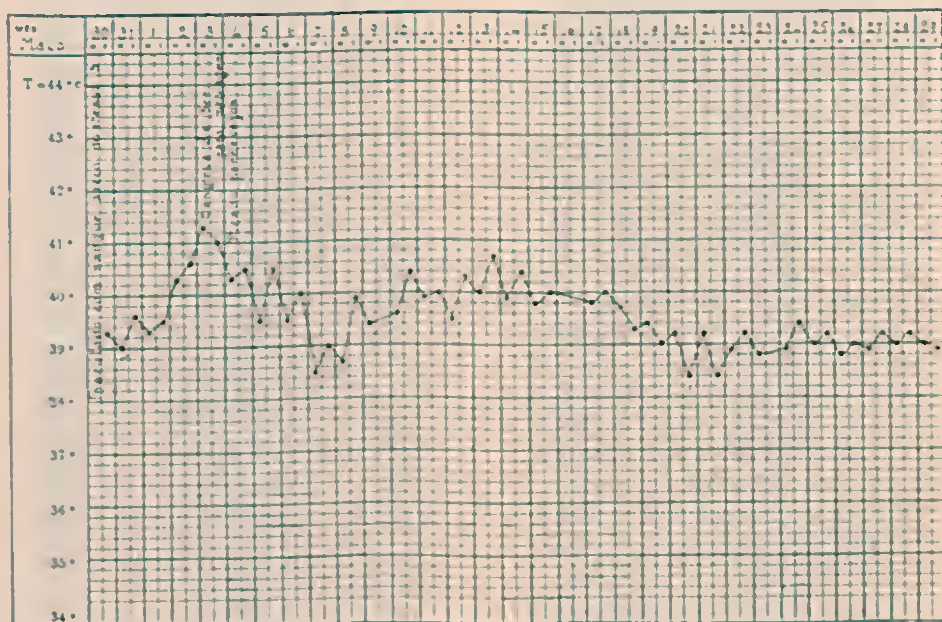
Graphico 21


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16

14.° - *Macacus rhesus* 27. Inoculado em 27-IV-1929, por via sub-cutanea, com emulsão de figado do *rhesus* 26. Depois de 3 dias de incubação, a temperatura subiu além de 40°, parecendo o evoluir caracteristico da infecção. A queda, porém, deu-se mais lentamente e a temperatura manteve-se, com uma oscillação, na media normal. O graphico 18 mostra a curva da reacção deste macaco durante um mês de observação. Em 17-VII-1929 o *rhesus* foi inoculado com o virus (emulsão de figado do *rhesus* 44), mostrando-se immunizado em relação á infecção.

15.° - *Macacus rhesus* 32. Inoculado em 9-V-1929, via peritoneal, com 0,1 gr. de sangue secco do *rhesus* 9, colhido no 1.° dia de temperatura elevada. Depois

Macacus rhesus N.° 35
(1929)



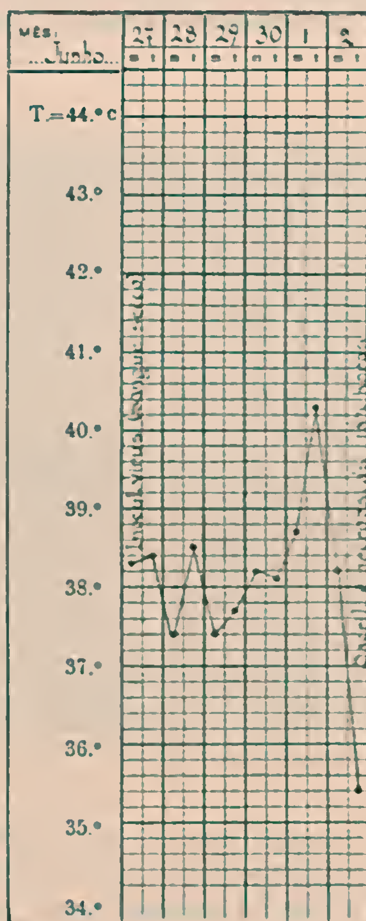
Graphico 20

de 15 dias de incubação, o *rhesus* apresentou reacção febril que durou alguns dias, em seguida aos quaes voltou ao normal. O graphico 19 mostra a curva durante o primeiro mês de observação. Em 17-VII-1929 foi inoculado com o virus activo, fresco, mostrando-se immunizado.

16.° - *Macacus rhesus* 35. Inoculado em 30-V-1929 com sangue secco do *rhesus* 3, depois de 2 meses de conservação. No 3.° dia a temperatura subiu além de 40°, attingindo 41°,3 no 4.° dia. Depois de mais 2 dias de reacção e volta á temperatura normal, observou-se novamente um periodo de reacção por varios dias e retorno ao normal. O graphico 20 mostra as reacções sobrevindas durante 1 mês de observação. Em 17-VII-1929 foi inoculado com o virus activo fresco (sangue do *rhesus* 44), resistindo á inoculação.

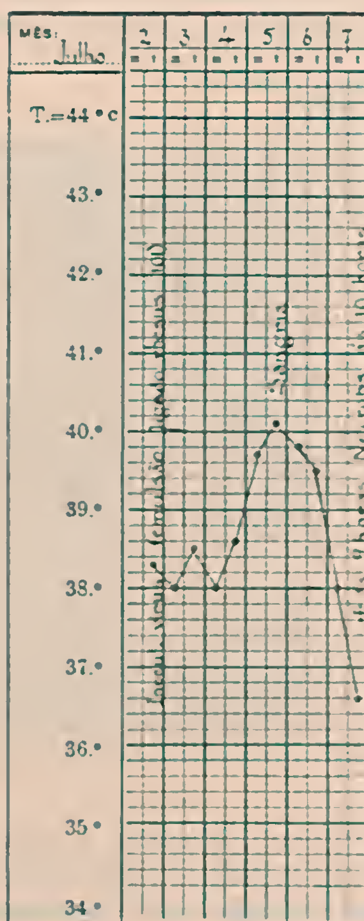
17.° - *Macacus rhesus* 41. Inoculado em 8-VII-1929 com sangue e figado do *rhesus* 38, depois de ter permanecido durante 10 dias, não congelado, somente na geladeira. Não apresentou reacção thermica caracteristica; em 30-VIII-1929 foi inoculado com virus activo fresco (emulsão de figado do *rhesus* 66), mostrando-se immunizado.

Macacus rhesus N.° 101
(1930)



Graphico 22

Macacus rhesus N.° 102
(1930)



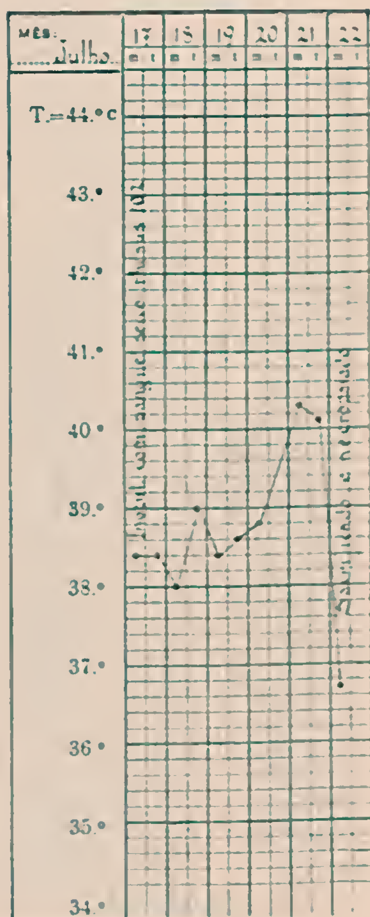
Graphico 23

18.° - *Macacus rhesus* 46. Inoculado em 13-VII-1929, por via sub-cutanea, com 5 cc. de sangue desfibrinado do *rhesus* 44, colhido nesse dia durante a reacção febril. Este *rhesus* não apresentou reacção febril durante longa observação; em 30-VIII-1929 foi inoculado com virus activo fresco (emulsão de figado do *rhesus* 66), que não occasionou tambem reacção caracteristica. O graphico 21 mostra a curva thermica do macaco até 20 dias após a 2.° inoculação, indicando

sua immunidade, devida, provavelmente, a uma infecção benigna, inapparente, que resultou da 1.ª inoculação, feita com o sangue de um macaco, cuja doença teve evolução typica, fatal.

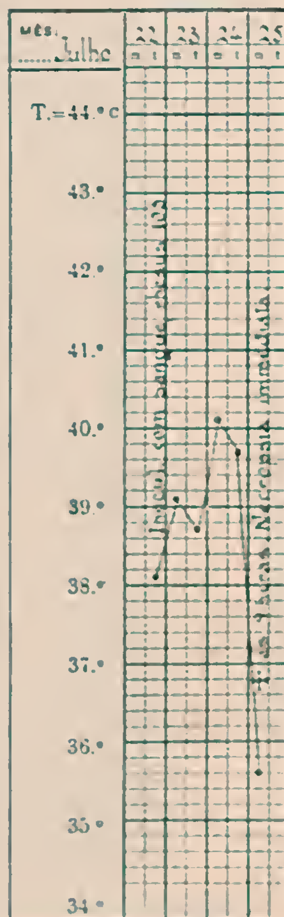
19.º - *Macacus rhesus* 67. Inoculado em 22-VIII-1929 com virus secco, sangue do *rhesus* 44, colhido na necropsia e conservado durante mais de um mês.

Macacus rhesus N.º 105
(1930)



Graphico 24

Macacus rhesus N.º 108
(1930)



Graphico 25

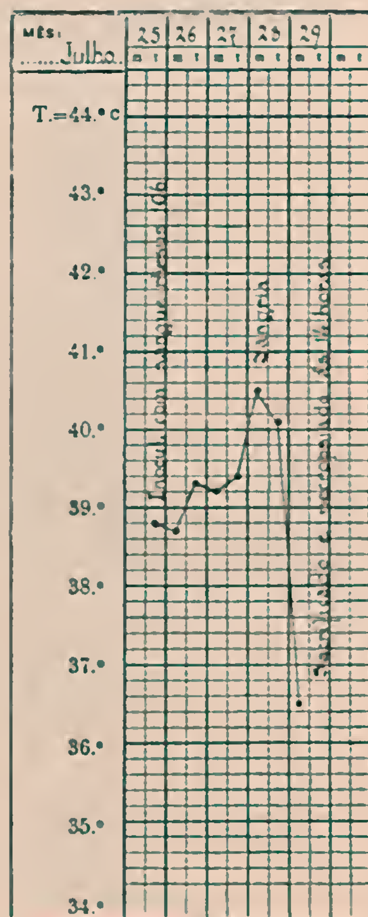
Não apresentou tambem reacção thermica, mostrando-se porém immunizado em relação a uma nova inoculação do virus activo.

Com os macacos do 2.º lote que recebémos no inicio do corrente anno, realizamos mais algumas passagens, não só para a conservação do virus, como para novas pesquisas. Estas passagens assim podem ser resumidas:

20.º - *Macacus rhesus* 101. Inoculado em 27-VI-1930 com o virus (sangue secco) conservado ha 48 dias. Evolução caracteristica da infecção e morte no fim de 5 dias (graphico 22).

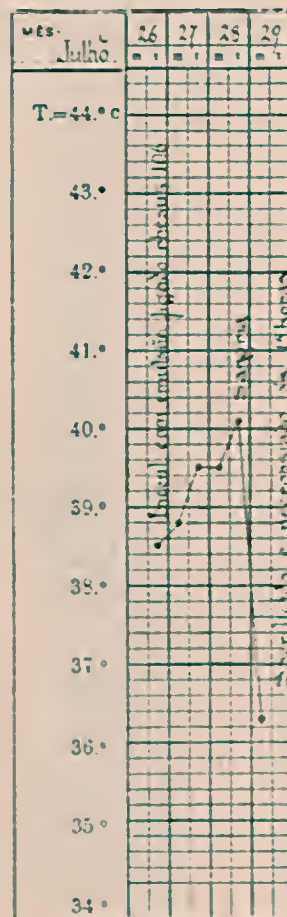
21.º - *Macacus rhesus* 102. Inoculado em 2-VII-1930 com emulsão de figado do *rhesus* 101. Evolução caracteristica da infecção e morte em 5 dias (graphico 23).

Macacus rhesus N.º 109
(1930)



Graphico 26

Macacus rhesus N.º 110
(1930)



Graphico 27

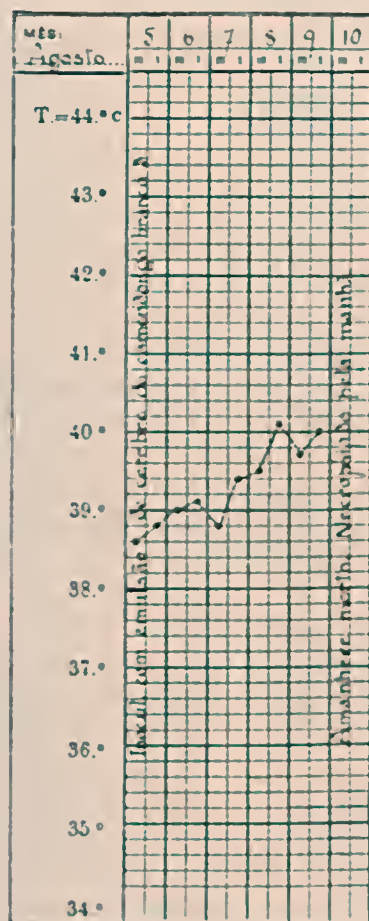
22.º - *Macacus rhesus* 105. Inoculado em 17-VII-1930 com sangue secco do *rhesus* 102, conservado desde 9-VII-1930. Evolução caracteristica da infecção e morte em 5 dias (graphico 24).

23.º - *Macacus rhesus* 108. Inoculado em 22-VII-1930 com 2 cc. de sangue do *rhesus* 105. Infecção caracteristica com evolução rapida e morte em 3 dias (graphico 25).

24.° - *Macacus rhesus* 109. Inoculado em 25-VII-1930 com 2 cc. de sangue do *rhesus* 106 (em experiencia) colhido em periodo de reacção febril. Infecção caracteristica, morte em 4 dias (graphico 26).

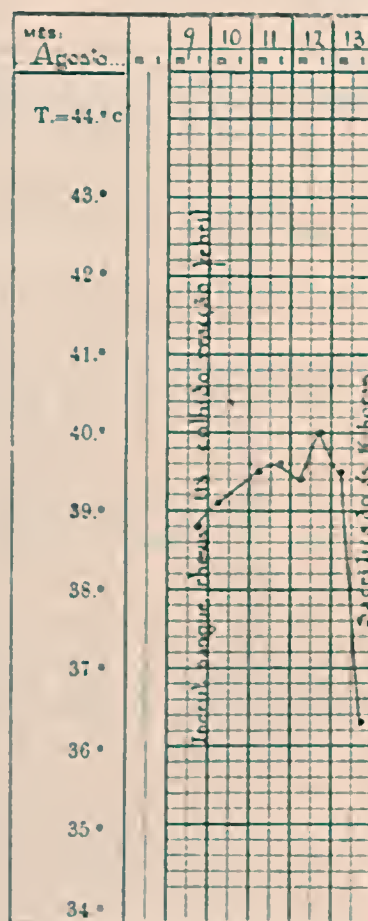
25.° - *Macacus rhesus* 110. Inoculado em 26-VII-1930 com emulsão de figado do *rhesus* 106. Infecção caracteristica e morte em 3 dias (graphico 27).

Macacus rhesus N.° 118
(1930)



Graphico 28

Macacus rhesus N.° 119
(1930)



Graphico 29

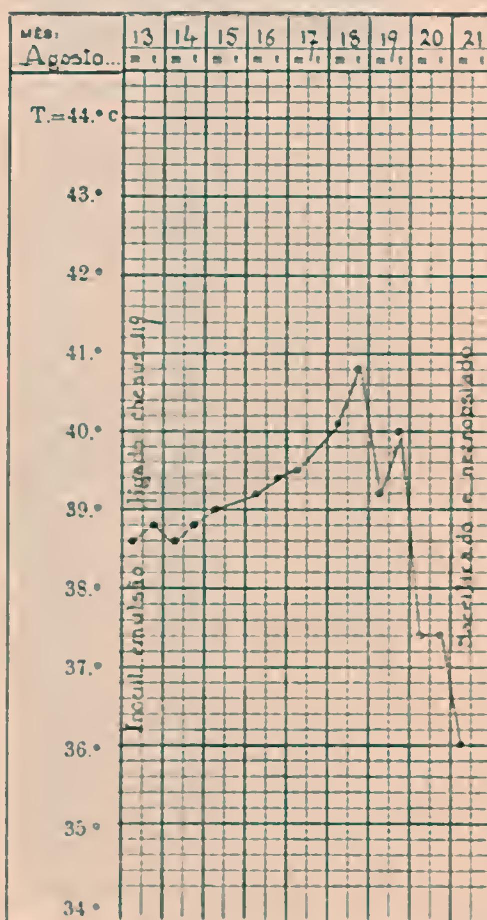
26.° - *Macacus rhesus* 118. Inoculado em 5-VIII-1930 com emulsão de cerebro do camondongo branco 3 (virus da 3.ª passagem no camondongo), por via peritoneal. Evolução caracteristica da infecção e morte no 5.° dia (graphico 28).

27.° - *Macacus rhesus* 119. Inoculado em 9-VIII-1930 com sangue do *rhesus* 118, colhido em reacção febril. Evolução caracteristica da infecção e morte em 4 dias (graphico 29).

28.° - *Macacus rhesus* 122. Inoculado em 13-VIII-1930 com sangue do *rhesus* 119, colhido do coração durante a necropsia. Evolução typica e morte em 8 dias (graphico 30).

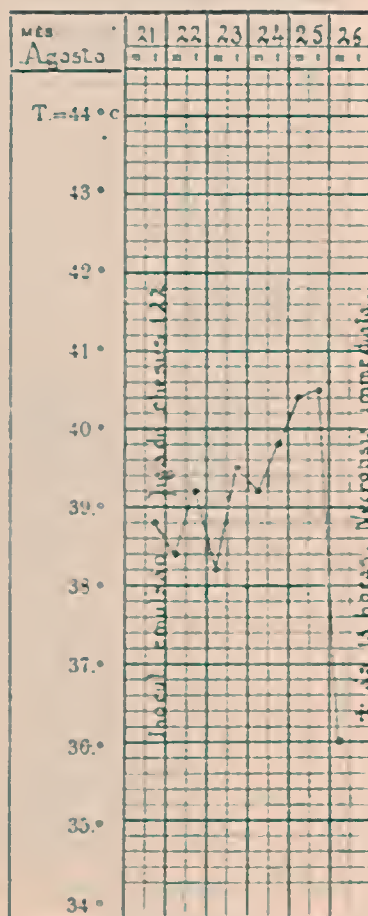
29.° - *Macacus rhesus* 124. Inoculado em 21-VIII-1930 com emulsão de figado do *rhesus* 122. Infecção amarillica caracteristica e morte em 5 dias (graphico 31).

Maccacus rhesus N.° 122
(1930)



Graphico 30

Macacus rhesus N.° 124
(1930)



Graphico 31

As passagens estão sendo continuadas.

Nesta 2.ª serie de inoculações, dois macacos até agora resistiram á inoculação virulenta:

30.° - *Macacus rhesus* 103. Inoculado em 8-VII-1930 com pequena porção de emulsão de figado do *rhesus* 102. Não teve reacção febril que passasse de 39°,6

(no 4.º dia), permanecendo em estado apparentemente normal; mostrou-se immunizado em relação ao virus activo, inoculado no fim de 20 dias. Depois de quasi 2 meses de observação, foi sangrado a branco para o aproveitamento do sôro em estudos sorologicos. A reacção do desvio de complemento, praticada então, foi fortemente positiva, conforme mostraremos juntamente com diversas outras reacções, em capitulo áparte.

31.º - *Macacus rhesus* 112. Inoculado em 29-VII-1930 com 1 cc. de sangue do *rhesus* 109, colhido do coração durante a necropsia. Este animal mostrou-se, posteriormente, tambem immunizado em relação á nova injecção de virus, resultando fortemente positiva a reacção do desvio de complemento praticada com o seu sôro.

IV - Identidade dos virus africano e americano

Aragão mostrou, em primeiro logar, a identidade do virus responsavel pelo surto epidemico do Rio de Janeiro com o virus africano, por meio de experiencias de immunização cruzada.

Davis chegou tambem á conclusão de que, immunologicamente, as amostras africana e brasileira do virus da febre amarella são identicas.

Pelas nossas experiencias acima descriptas a identidade dos dois virus ficou igualmente estabelecida. Os *rhesus* que resistiram á infecção com o virus americano mostraram-se immunizados em relação ao africano, com uma excepção apenas.

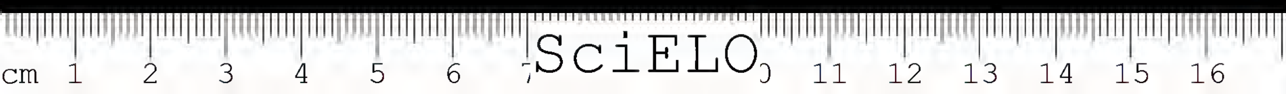
Tambem o *Macacus rhesus* 10, inoculado em 15-III-1929 com 1 cc. da vaccina preparada com material do *rhesus* 1 (virus americano), segundo a technica de Aragão, mostrou-se immunizado em relação ao virus activo africano inoculado 12 dias depois.

A menor sensibilidade dos *rhesus* ao virus americano deve ser attribuida ao facto de, por motivos desconhecidos, não se ter ainda conseguido obter uma amostra perfeitamente adaptavel a estes animaes, apezar do grande esforço dispendido neste sentido, principalmente, por Davis e Burke, na Bahia e por Aragão, no Rio de Janeiro.

Outra confirmação da identidade dos dois virus é fornecida pelos estudos sorologicos realizados já por differentes autores e pelo facto de um antigeno, preparado com figado de animal victimado pelo virus africano, mostrar sensibilidade em relação á infecção no nosso continente, traduzida pela reacção do desvio do complemento com sôros de convalescentes e de pessoas naturalmente immunizadas, segundo as verificações de Frobisher e as nossas realizadas em collaboração com J. Travassos.

V - Conservação e propriedades do virus da febre amarella

Ao contrario do que occorre no homem, onde somente se apresenta nos tres primeiros dias da infecção, desapparecendo do sangue nos dias immediatos e não



sendo tambem encontrado nos orgams, o virus amarillico apparece no sangue dos *rhesus* inoculados desde o 2.° dia e talvez antes, mas principalmente depois que se inicia a reacção febril e perdura durante todo o tempo da infecção, sendo tambem encontrado nos orgams.

Nestas condições, o seu meio de conservação ideal é o organismo destes animaes sensiveis, cujo sangue e orgams conservados sob certas condições se costumam utilizar durante um tempo determinado.

Vejamos, pois, os methodos de conservação do virus.

1.° - Contensão e inoculação do *Macacus rhesus*.

O manejo dos *Macacus rhesus* é relativamente facil, exigindo apenas uma certa pratica do pessoal encarregado.

Varias technicas têm sido propostas para o manejo destes animaes, quando infectados principalmente, afim de que se reduzam ao minimo os riscos que correm os experimentadores e seus auxiliares.

Os animaes são mantidos em gaiolas especiaes, de preferencia fechadas lateralmente, para evitar que se agitem muito á approximação de qualquer pessôa. As temperaturas devem ser tomadas duas vezes ao dia, pela manhã e á tarde, evitando-se que o animal se debata muito, o que faria, por si só, elevar a temperatura.

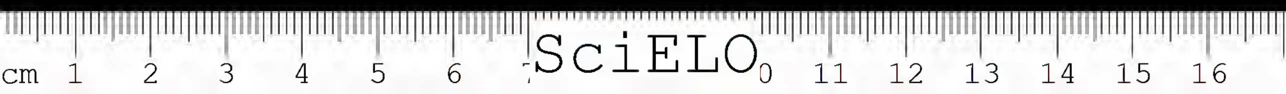
Para evitar estes inconvenientes, imaginámos uma pinça especial, curta e curva na parte que prende o animal e com longos cabos, em forma de tezoura (Fig. 8).

Si o animal está em gaiola fechada nos lados, retira-se primeiro da parte anterior (com tela) a bandeja de cerca de 10 cm. de altura que é livre e apenas presa por um gancho lateral. Pela abertura formada, que não deixa sahir o macaco, introduz-se a pinça e prende-se o animal pelas costas. Feito isto, abre-se a porta da gaiola, dando-se sahida ao animal preso pela pinça. Levando-se o macaco de encontro ao chão, pode-se facilmente segural-o pela cabeça e, soltando-se a pinça, retel-o com uma só mão, sendo apenas necessario manter-lhe os dois braços virados para as costas. Com a mão livre, o auxiliar segura as pernas, podendo então o operador fazer a inoculação desejada ou ser tomada a temperatura rectal.

Si a gaiola for aberta, de grades, a pinça é passada através destas e o animal é mantido preso, podendo ser tomada a temperatura através das grades, sem necessidade de se retirar o animal.

Para as sangrias, no coração de preferencia, o animal é mantido deitado numa taboa, com os braços amarrados para traz e as pernas presas em furos apropriados da taboa.

As sangrias, necropsias e inoculações de material virulento devem ser feitas com o maximo cuidado. O operador deve usar luvas de borracha e tomar todas as precauções para evitar dispersão do material infectante, o que poderia ter funestas consequencias.



Os animaes infectados são mantidos isolados e em installações adequadas, ao abrigo de mosquitos e insectos hematophagos.

2.° - Conservação do virus *in natura*.

O virus pode conservar-se no sangue ou no orgam (figado) *in natura* durante um certo numero de dias.

Sawyer, Lloyd e Kitchen verificaram que o virus pode conservar-se no sangue coagulado ou no citratado durante 30, e mesmo 35 dias, se for mantido no refrigerador de 1° a 4°C. Segundo estes autores, no sangue glycerinado (partes iguaes), o virus ainda é activo no fim de 60 dias, embora dilate o periodo de incubação da infecção; em 100 dias, já não infecta, mas immuniza o macaco.

Com o figado congelado, a -12°C., estes autores verificaram que a actividade do virus se manifestava ainda ao cabo de 30 dias.

Quando congelado, no sangue, segundo verificámos, o virus americano se conservou activo até 18 dias, agindo depois como vaccina. Identico resultado já havia obtido Hindle.

3.° - Conservação do virus secco.

Seccando o sangue ou figado que o contém, o virus amarillico melhor se conserva, podendo resistir por muitos meses. Hindle acredita que a conservação por este meio seja quasi indefinida.

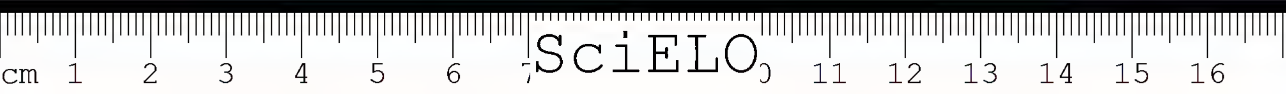
Verificámos, com o virus africano que Aragão nos cedeu, a sua actividade, nestas condições, depois de 107 dias.

Esta resistencia, tambem verificada com outros virus já estudados, muito facilita sua manutenção nos laboratorios, tornando-a mais economica, pois é sobremodo elevado o preço dos animaes sensiveis necessarios para as passagens constantes.

O sangue, desfibrinado ou não, ou o figado cortado em finas fatias é collocado em capsulas de Petri largas e levado para um seccador de vacuo, contendo acido sulfurico ou chloreto de calcio, sendo que empregamos somente o acido sulfurico.

Estabelecido o vacuo, geralmente a seccagem é completa e perfeita no fim de 24 horas, se a camada do material for fina e convenientemente disposta; não ha em nosso meio, necessidades do apparelho ser mantido nesse tempo em baixa temperatura.

Retirado o material do apparelho, o sangue ou figado seccos são destacados com espatula especial, com o maior cuidado para evitar que qualquer particula possa ser lançada fora e contaminar o operador. O virus secco é então collocado em tubos fortes, esterilizados, previamente estrangulados numa estremidade; faz-se o vacuo nesses tubos, depois do que elles são fechados ao maçarico em o nivel do estrangulamento e, em seguida, parafinados para maior garantia e conservados no frigo em temperatura abaixo de 0°.



4.° - Resistencia do virus.

O estudo da resistencia do virus da febre amarella aos agentes physicos e chimicos ainda não foi feito de um modo completo.

Sabe-se que é pouco resistente ao calor, que o destróe a 56°, e tambem aos agentes chimicos. O formol, o phenol e a glycerina o attenuam e destróem, o mesmo acontecendo com o chloroformio puro, segundo verificámos. Esta acção dos antisepticos se manifesta mais rapidamente na temperatura ambiente ou em temperatura que não seja muito proxima á optima para conservação do virus, caso em que sua attenuação é mais prolongada.

5.° - Resistencia á acção dos antisepticos sob certas condições.

E' facto conhecido que certos virus (o vaccinico, por exemplo) mantidos sob certas condições, de temperatura principalmente, apresentam maior resistencia á acção de certos antisepticos.

O virus vaccinico, numa polpa glycerinada, mesmo addicionada de certa proporção de phenol, capaz de prejudicar outros microorganismos, conserva sua actividade por um tempo relativamente longo, se é mantido em condições optimas de temperatura (abaixo de 0°C.). Muitos laboratorios, principalmente nos Estados Unidos, empregam uma vaccina glycerinada e phenolada. O mesmo acontece com o verde brilhante, tambem usado na purificação da polpa vaccinica e que age, como já verificamos, sobre as bacterias associadas, respeitando o virus, naquellas condições. Se, porem, taes condições optimas não são mantidas (simples conservação da polpa durante algumas semanas na temperatura do laboratorio), o virus é perturbado em sua actividade e mesmo destruido. Dahi, a necessidade de serem as vaccinas phenoladas utilizadas no mais breve prazo possivel depois da sua sahida do laboratorio, o que as torna improprias para uso entre nós.

Por isto, a verificação da resistencia do virus amarillico, quando conservado sob certas condições optimas, seria, a nosso vêr, de grande interesse.

Para esta pesquisa, o material virulento (figado especialmente) de um animal infectado com o virus africano e sacrificado no periodo pre-agonico, foi colhido asepticamente, pesado e triturado finamente num gral com areia. Separada uma parte para a experiencia em vista, foi ella addicionada com 5 vezes o seu peso de agua distillada phenolada a 5 °/₀₀ e formolada a 2 °/₀₀. Depois de bem emulsionado e collocado num balão, permaneceu o material em maceração na Frigidaire a 2°C. (condições favoraveis) durante 7 dias, ou na estufa a 37° (condições desfavoraveis), durante o mesmo prazo. No fim deste periodo de maceração, durante o qual soffreu agitações diarias, o material foi filtrado em funil com 4 dobras de gaze, distribuido em empolas que foram immediatamente fechadas á lampada, para isolar do ar athmospherico, sendo em seguida levadas para a Frigidaire onde foram conservadas.

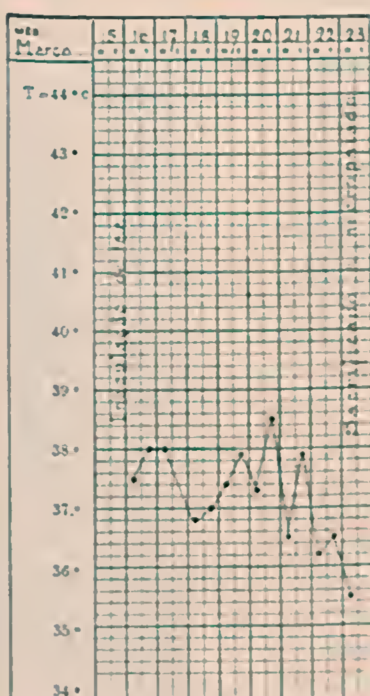
As nossas verificações foram feitas com o virus de 3 *rhesus*, todos com infecção clinicamente typica e com confirmação histo-pathologica.

Resumiremos os resultados obtidos:

a) Material proveniente do *Macacus rhesus* 6 permaneceu, depois de phenolado e formolado, em maceração na temperatura de 2°C. durante 6 dias e, nas mesmas condições, outros 2 depois de empolado, ao total 8 dias após a colheita. Foi inoculado na dose de 1cc. no *rhesus* 11, que morreu no fim de 8 dias, não apresentando reacção thermica, como se vê do graphico 32.

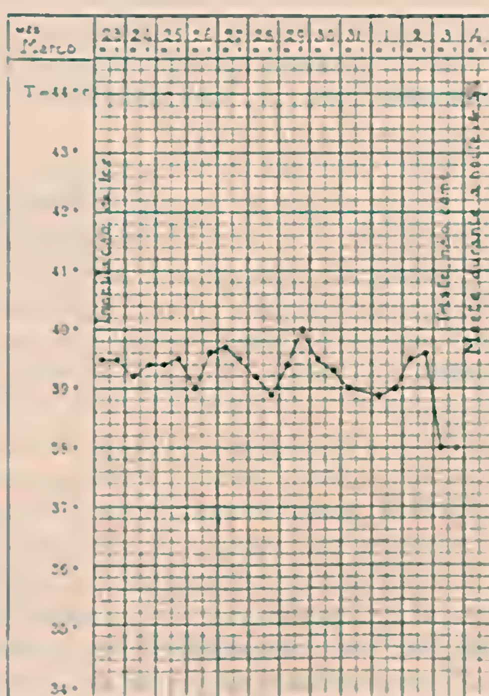
b) No fim de mais 8 dias (as empolas sempre conservadas a 2°C.) ou sejam 16 dias após a colheita, o mesmo material na dose de 1cc. tambem foi inoculado

Macacus rhesus N.° 11
(1929)



Graphico 32

Macacus rhesus N.° 15
(1929)



Graphico 33

no *Macacus rhesus* 15 que, por sua vez, morreu no fim de 11 ½ dias, não apresentando tambem reacção febril, a não ser em um dia, quando a temperatura attingiu a 40°, como se vê do graphico 33.

c) Emulsão de figado deste macaco (*rhesus* 15) foi inoculada no *Macacus rhesus* 20. Este teve uma evolução typica da infecção amarillica experimental, como se vê no graphico 34, morrendo em 4 ½ dias. Verificou-se assim que o virus, mesmo sob a acção dos antisepticos, porem mantido em condições favoraveis, continuava activo no fim de 16 dias, provocando uma infecção inapparente,

sem reacção febril. Todavia a sua virulencia se exaltou novamente com a passagem feita.

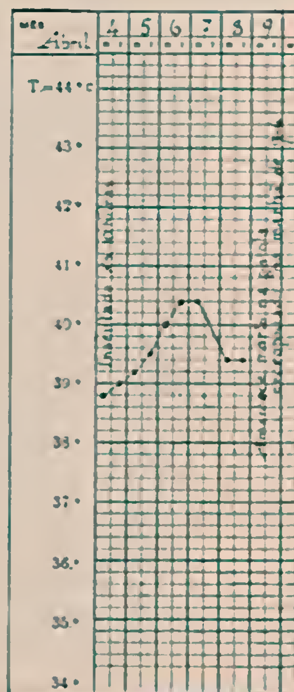
d) Material proveniente de outro *Macacus rhesus* (n.° 3), preparado e conservado como foi assignalado, foi inoculado na dose de 1 cc. no *Macacus rhesus* 28, depois de decorridos 27 dias da colheita. Este animal não apresentou reacção thermica caracteristica, embora a febre nos primeiros dias tivesse attingido 40°. No fim de 33 dias após a inoculação, apresentou-se triste, não se alimentando. No dia seguinte amanheceu moribundo, sendo sacrificado e necropsiado. O exame anatomico e histo-pathologico confirmou ter havido infecção pelo virus.

e) Material proveniente de outro *Macacus rhesus* (n.° 16) e tratado nas mesmas condições, tendo soffrido, porem, maceração durante 7 dias na estufa a 37°, depois empolado e conservado na Frigidaire a 2°C. foi, decorridos 25 dias da colheita, inoculado no *Macacus rhesus* 29. Este macaco nada apresentou de anormal e continua vivo.

Os 2 *rhesus* 28 e 29 foram inoculados no mesmo dia. No fim de 20 dias, como nada apresentassem de anormal, soffreram uma 2.ª inoculação de sangue desfibrinado do *rhesus* 33 que havia sido inoculado com material avirulento e que não se mostrou infectado, como se verificou tambem pelo resultado da inoculação de um *rhesus* testemunha feita na mesma occasião.

Verifica-se assim que o virus, mesmo tratado por certos antisepticos, segundo o modo que acaba de ser assignalado, porém mantido em condições optimas ou favoraveis de temperatura, pode não morrer e ainda determinar infecção inapparente, (comprovada por passagem, no fim de 16 dias), mesmo no fim de 27 dias. Isto não aconteceu no fim de 25 dias, com o virus nas mesmas condições, desde que houve uma permanencia durante alguns dias na temperatura de 37°.

Macacus rhesus N.° 20
(1929)



Graphico 34

6.° - Filtrabilidade do virus amarillico.

Em seu trabalho fundamental, Stokes, Bauer e Hudson verificaram que no sangue dos animaes infectados, o virus atravessava as velas Berkfeld V e N e o filtro de asbestos de Seitz, não atravessando a vela W. Quando no organismo do mosquito, o virus não atravessa estas velas, o que poderia fazer pensar numa qualquer modificação da sua morphologia, pelo menos quanto ao tamanho, durante sua evolução no insecto vehiculador. Acreditamos porém que se trata de differenças physico-chimicas de meio, que facilitam ou impedem a retenção do

virus pelas velas. Emulsionando mosquitos infectados em meios especiaes, caldo glycosado (pH=8) ou em extractos de orgams, é provavel que o virus atravesse os filtros, da mesma forma que o faz quando no sangue e orgams dos animaes. Autorizam este modo de ver as nossas experiencias feitas com R. Godinho sobre a filtrabilidade do virus vaccinico. Esta supposição foi em parte confirmada recentemente por Sawyer e Frobisher que verificaram a filtrabilidade do virus quando em mosquitos, fazendo a emulsão dos insectos em sôro de macaco normal em vez de em solução physiologica. Nestas condições o virus atravessa as velas Berkfeld N, como acontece quando no sangue dos macacos infectados.

Em trabalho recente, Bauer e Mahaffy assignalaram que o virus amarillico, tanto no sangue, como nos mosquitos infectados, é filtravel através das velas Berkfeld de todos os graus e tambem a de Chamberland L2. Verificaram que o virus é pouco resistente, quando em solução physiologica a 0,9 por 100 (o que é discutivel), solução de Locke e Ringer, caldo hormonico ou agua distillada, e que a addição de sôro normal de macaco, na proporção a 10 % ou mais, reduz o effeito viricida destes meios.

7.° - **Passagem do virus através da pelle e mucosas.**

Entre os pontos assignalados e discutidos na conferencia sobre a febre amarella em Dakar (23 de abril a 1.° de maio de 1928) figura a possibilidade do virus amarillico, contido no sangue dos doentes no periodo infectante ou dos *rhesus* infectados, atravessar a pelle.

Marchoux, trabalhando com o virus de Sellards, não conseguiu a infecção do macaco collocando o virus sobre a pelle intacta; conseguiu, porem, a infecção depositando o material na superficie da pelle, depois de escarificada, ou na conjunctiva do animal.

Bauer e Hudson tambem fizeram experiencias nesse sentido. Tomaram 3 *rhesus* e os infectaram, collocando sangue virulento, respectivamente sobre a pelle intacta, raspada a navalha e escarificada. Uma segunda experiencia, sem escarificação, foi negativa, o que attribuiram a uma concentração insufficiente do virus, pois que, repetida com virus activo, deu resultado positivo. Depositaram uma gotta de sangue virulento na conjunctiva de um macaco, e 0,5 cc. na bocca de um outro; nenhum dos dois se infectou. Com emulsão de mosquitos infectados, depositada sobre a pelle, só verificaram a infecção quando a superficie havia sido anteriormente escarificada.

Aragão e Costa Lima verificaram ser possivel a infecção de *rhesus*, através da pelle e da mucosa ocular intactas, por meio do virus eliminado nas fezes por mosquitos infectados.

Por todos estes factos, está demonstrada a possibilidade do virus da febre amarella atravessar a pelle e a mucosa ocular, mesmo intactas. E' provavel ter sido este o mechanismo da infecção de illustres bacteriologistas no decurso das suas experiencias. Apezar dos cuidados de que se cercaram, não se deve eliminar a possibilidade de se terem infectado com material virulento desse modo ou então

por meio do virus depositado com as fezes de algum insecto hematophago não estudado ainda.

Muitas incognitas ainda estão desafiando solução por parte dos investigadores, no que diz respeito aos varios aspectos do problema da transmissibilidade da febre amarella.

VI - Virus amarillico neurotropico e sensibilidade do camondongo

Theiler, em publicações recentes, mostrou os resultados bastante interessantes de suas investigações relativamente á sensibilidade do camondongo branco ao virus amarillico.

Empregando uma technica semelhante á usada por Andervont no estudo do virus herpetico e seu comportamento nos camondongos, poude Theiler verificar a sensibilidade desses animaes ao virus amarillico, quando inoculado por via cerebral.

Desde novembro de 1928, quando iniciou seus estudos, até janeiro de 1930, durante um periodo de 14 meses, Theiler praticou 75 passagens do virus de camondongo a camondongo, pela inoculação cerebral de pequena quantidade de emulsão de cerebro do animal infectado, morto ou sacrificado já no periodo final da infecção.

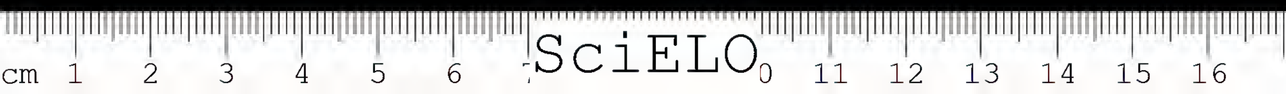
Os camondongos não apresentavam qualquer symptoma caracteristico; no dia em que a infecção se approximava do periodo final, observava-se perda da actividade do animal; nesse dia, ou no seguinte, seu estado aggravava-se e observava-se muitas vezes paralysia dos membros posteriores e morte dentro de pouco tempo.

Theiler verificou um augmento da virulencia do virus depois de algumas passagens: até a 5.ª, a morte se dava no 7.º ou 8.º dia; da 5.ª passagem em diante, a virulencia augmentava gradativamente, sendo que, na 20.ª passagem, o periodo da evolução da infecção era de 6 ou 7 dias; na 30.ª, reduzia-se a 6 dias geralmente; e, nas ultimas passagens, esse periodo era de 5 dias, pois então os animaes inoculados já haviam morrido ou estavam prestes a morrer.

Em relação ás differentes vias de infecção dos camondongos, a de resultados mais constantes foi a via intra-cerebral. A injecção cerebral do camondongo exige cuidados technicos especiaes. Para a infecção basta uma quantidade minima do material virulento: apenas 0,05 a 0,02 de cc. ou menos da emulsão, preparada com um cerebro infectante em 5 cc. de agua physiologica.

Depois de alguma pratica das inoculações cerebraes em camondongos, estes resistem perfeitamente ao traumatismo; se isto não acontece, a morte dar-se-á immediatamente ou dentro de pouco tempo.

As vias intra-ocular e intra-espinhal podem ser usadas, porém apresentam maiores difficuldades technicas, os resultados são inconstantes, e, quando a infecção se processa, a evolução é mais longa do que pela via cerebral; por via intra-cutanea, muscular ou testicular, os resultados são negativos, porém um certo numero dos animaes mostra-se immunizado em relação á infecção cerebral.



Por via peritoneal, Theiler verificou a sensibilidade do joven camondongo, desde o nascer até duas semanas de idade, sendo a infecção de 1 a 5 dias mais longa do que nos testemunhas infectados por via cerebral, porém o virus mantem a mesma distribuição que por esta ultima via, sendo já encontrado no cerebro do joven camondongo 24 horas após a inoculação.

O virus torna-se neurotropico para o camondongo, no qual pode ser encontrado no cerebro, medulla, nervo sciatico e glandula supra-renal, e ausente, ou apenas em proporções minimas, no sangue, figado, baço, rim e testiculos. A passagem do virus pelo systema nervoso é centrifuga. Theiler verificou que a medulla é já infectante no 3.° dia após a inoculação cerebral, ao passo que o nervo sciatico e supra renal só o são no 5.° dia.

O virus amarillico neurotropico do camondongo conserva-se, segundo ainda as verificações de Theiler, durante 160 dias quando mantido a -8°C., havendo uma diminuição progressiva da virulencia; em agua glycerinada a 50 % e na temperatura de 2 a 4°C., durante 58 dias; em agua physiologica e nesta temperatura, o virus mostrou-se activo depois de 53 dias e não em 100 dias.

Um facto interessante em relação ao virus do camondongo reside na attenuação de sua actividade para o *Macacus rhesus* depois de algumas passagens. Theiler fez as seguintes verificações neste sentido:

1.ª - Virus do camondongo, da 3.ª passagem, inoculado em *Macacus rhesus* determinou infecção experimental caracteristica e morte do animal em 5 dias;

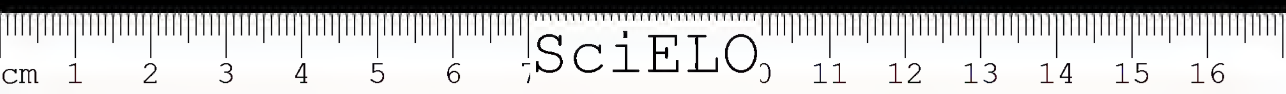
2.ª - Virus da 29.ª passagem, sendo inoculado, apenas provocou no *rhesus* temperatura no 6.° e 7.° dias; o animal resiste e mostra-se immunizado em relação a nova inoculação virulenta feita no 22.° dia;

3.ª - Virus da 42.ª passagem não determinou reacção febril, nem outro symptoma até o 47.° dia, quando o animal se apresentou doente, amanhecendo morto no dia seguinte. O exame histo-pathologico mostrou lesões discretas, com inclusões intranucleares nas cellulas hepaticas.

Theiler verificou a acção do sôro immune e do sôro de convalescente sobre o virus, empregando este após centrifugação da emulsão e contacto com o sôro durante 20 minutos a 2 horas, seguindo-se a inoculação intra-cerebral.

Em resumo verificou esse pesquisador: com o sôro immune, de 10 animaes injectados 2 morreram e 8 resistiram á infecção; 12 testemunhas (com sôro normal) injectados, todos morreram. Com o sôro de convalescentes, excluidos os animaes que morreram antes do 3.° dia, de 5 injectados 4 foram protegidos e 1 morreu, após um periodo de incubação mais longo.

Nestas verificações tem certa importancia a technica do preparo da emulsão virulenta, que deve ser centrifugada, não tendo influencia sobre os resultados o tempo de contacto do virus com o sôro, antes da inoculação. Em relação á anatomia e histologia pathologica, Theiler verificou poucas lesões macroscopicas. Não se observou ictericia, sendo commummente encontrados signaes de hemorrhagia no estomago. As lesões histologicas observadas no cerebro eram as de uma



encephalite: proliferação do endothelio vascular e infiltração perivascular de cellulas mononucleares. Muito caracteristicas são as alterações nucleares das cellulas ganglionares semelhantes ás observadas nas cellulas do figado dos *rhesus* infectados e descriptas por M. Torres.

Parte experimental.

Logo que tivemos conhecimento da primeira nota publicada por Theiler, procurámos verificar os seus resultados, quanto á sensibilidade do camondongo branco ao virus amarillico.

O nosso primeiro camondongo foi inoculado em 8-VII-1930 com uma emulsão de figado de um *rhesus* infectado e necropsiado nesse dia. Inoculámos 3 camondongos com 0,02 cc. da emulsão e apenas 1 não succumbiu em poucos minutos. Este morreu na noite do 6.° para o 7.° dia, sendo inoculados 3 novos camondongos com emulsão do cerebro. Ainda desta vez, apenas 1 resistiu ao traumatismo da injecção e conseguimos a 2.ª passagem do virus no camondongo, cuja infecção durou 10 dias. Para a 3.ª passagem já a nossa technica era melhor. O unico camondongo inoculado teve a infecção cuja evolução foi tambem de 10 dias.

Para as inoculações cerebraes no camondongo empregámos uma seringa graduada em centesimos de cc., como as usadas para injecção de tuberculina, e munida de uma agulha fina, e com a curva de apenas 2 millimetros. A emulsão foi feita de modo a se ter um cerebro em cerca de 5 cc. de solução physiologica, tendo sido o orgam triturado num gral e a agua addicionada aos poucos. Preparada a seringa com a emulsão, o camondongo foi anesthesiado pelo ether. A inoculação foi então feita, sendo a pelle e o osso atravessados facilmente, tendo-se o cuidado de virar a agulha para cima, em direcção á parede interna do osso, logo que se sentia que este fora atravessado. Isto diminue a compressão exercida directamente sobre o cerebro e os animaes resistem facilmente á injecção. A quantidade do liquido injectada deve ser pequena, não superior a 0,05 cc. Geralmente inoculámos 0,01 a 0,02 cc..

Com o virus da 3.ª passagem no camondongo, foram inoculados: 1 *Macacus rhesus*, 2 novos camondongos brancos, 1 coelho e 1 cobaia.

O *rhesus*, inoculado por via peritoneal, teve uma infecção amarillica caracteristica, morrendo em 5 dias, tendo sido feita nova passagem do virus para outro *rhesus*.

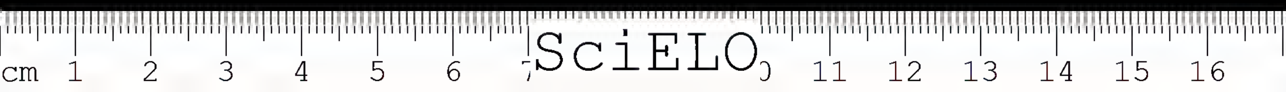
Os 2 camondongos inoculados para a 4.ª passagem tiveram uma infecção de 7 dias. O coelho e a cobaia, tambem inoculados por via cerebral, nada de anormal apresentaram durante longa observação.

Os camondongos (2) inoculados para a 5.ª passagem morreram tambem em 7 dias; o da 6.ª passagem tambem em 7 dias, o mesmo acontecendo com o da 8.ª passagem.

Com o virus da 4.° passagem, além de camondongos brancos foram inoculados um gato e um ratinho do campo. Este ultimo morreu em 3 dias, sendo

feita passagem para um camondongo branco que resistiu á infecção. O gato nada apparentemente demonstrou de anormal. Com sangue do *rhesus* infectado com virus da 3.ª passagem em camondongo, foram inoculados, além de novo *rhesus*, um gato e um ratinho do campo. Aquelle nada apresentou de anormal e este amanheceu morto no 2.º dia. A causa da morte foi tida como accidental, sendo o cerebro conservado em agua glycerinada a 50 %. Em virtude do resultado obtido com outro ratinho da mesma especie inoculado com o virus, da 4.ª passagem, resolvemos inocular o material conservado depois de 4 dias num camondongo branco. Este teve infecção apparentemente semelhante á obtida com o virus, morrendo em 5 dias. Novo camondongo, porém, inoculado para passagem, resistiu á infecção.

As passagens que até agora realizámos com o virus e alguns pormenores experimentaes poderão ser resumidos no eschema junto, onde não incluimos as experiencias accessorias, como inoculação de gatos, rato do campo, coelho e cobaia, mas somente camondongos brancos e tambem o *rhesus* para confirmação da infecção daquelles pelo virus amarillico:



Camondongo branco 1

Inoculação cerebral com virus amarilico (emulsão de figado do **rhesus** 102) em 8-VII-1930. Amanheceu morto em 16-VII-1930.



Camondongo branco 2

Inoculação cerebral com emulsão de cerebro do camondongo branco 1 em 16-VII-1930. Em 26-VII-1930 apresentou-se mal: phenomenos de paralysia dos membros posteriores, movimentos giratorios para a esquerda e excessiva coceira após qualquer excitação, perdurando uns 15 minutos. Foi sacrificado nesse dia.



Camondongo branco 3

Inoculação cerebral com emulsão de cerebro do camondongo branco 2 em 26-VII-1930. Em 5-VIII-1930 apresentou-se triste, arrepiado com paralysia dos membros posteriores, sendo sacrificado.



Camondongo branco 4

Inocul. cerebral com emulsão cerebro camondongo branco 3 em 5-VIII-1930. Em 11-VIII-1930 iniciou-se a paralysia dos membros posteriores. Em 12-VIII-1930 amanheceu morto.

Camondongo branco 5

Inocul. cerebral com emulsão cerebro camondongo branco 3 em 5-VIII-1930. Evolução e morte, como para o camondongo branco 4.

Macacus rhesus 118

Inocul. peritoneal com emulsão cerebro do camondongo branco 3 em 5-VIII-1930. Em 9-VIII-1930, com reacção febril, foi sangrado. Em 10-VIII-1930 amanheceu morto na gaiola.



Camondongo branco 6

Inocul. cerebral com emulsão cerebros camondongos brancos 4 e 5 em 12-VIII-1930. Amanheceu morto em 19-VIII-1930.

Camondongo branco 7

Inocul. cerebral com emulsão cerebros camondongos brancos 4 e 5 em 12-VIII-1930.

Macacus rhesus 119

Inocul. peritoneal com 2cc. de sangue do **rhesus** 118 em 9-VIII-1930. Em 13-VIII-1930 já em hypothermia foi sacrificado e necropsiado.



Camondongo branco 10

Inocul. cerebral com emulsão cerebro camondongo branco 6 em 19-VIII-1930. Paralysia dos membros posteriores em 26-VIII-1930, sendo sacrificado á tarde desse dia.



Camondongo branco 12

Inocul. cerebral com emulsão cerebro do camondongo branco 10 em 26-VIII-1930.

O eschema acima mostra-nos que o symptoma clinico, geralmente observado nos camondongos, é a paralysia dos membros posteriores, que precede á morte do animal; disto podem dar uma idéa as figuras 9 e 10.

A primeira passagem que obtivemos, teve uma evolução de 8 dias; as 2.ª e 3.ª de 10 dias; as 4.ª, 5.ª, 6.ª de 7 dias.

Com o virus da 3.ª passagem em camondongo infectámos um *rhesus*, sendo a infecção confirmada, não só pelo exame histo-pathologico, como pela passagem para novo macaco (graphicos 28, 29, 30 e 31).

As passagens do virus em camondongos estão sendo continuadas. As verificações histo-pathologicas já feitas em cortes de cerebros de alguns dos animaes confirmam as de Theiler em relação ás lesões de encephalite e inclusões intranucleares semelhantes ás estudadas por Torres.

Iniciámos igualmente, com o nosso virus neurotropico para o camondongo, uma serie de pesquisas, cujos resultados serão dados em trabalhos posteriores.

Do que deixámos assignalado acima sobre as verificações por nós feitas até agora, em confirmação dos trabalhos de Theiler, se pode concluir pela sensibilidade do camondongo branco ao virus amarillico quando inoculado por via cerebral, e pela possibilidade de manter-se o virus nesse animal por passagens successivas de cerebro a cerebro, sendo que o virus da 3.ª passagem ainda é capaz de provocar no *Macacus rhesus* uma infecção amarillica caracteristica.

Capitulo II

Transmissores e vehiculadores do virus amarillico

1.° - Transmissão do virus pelos mosquitos *Aëdes aegypti*.

A theoria da transmissibilidade da febre amarella pelos mosquitos *Aëdes (Stegomyia) aegypti* foi novamente confirmada no que diz respeito á infecção experimental do *Macacus rhesus*.

Bauer e Hudson verificaram que, depois de ingerido pelo mosquito, o virus necessita de um certo periodo de tempo para que possa ser por elle transmittido a outro animal. Esse periodo de incubação do virus no mosquito é geralmente de 12 dias, sendo provavel poder ser elle menor em certas condições, de temperatura principalmente.

Aragão e Costa Lima descreveram algumas experiencias sobre a transmissão do virus pela picada, tomando precauções para evitar a possibilidade da infecção pelas fezes dos mosquitos. Depois de experiencias negativas com a picada após 4 e 6 dias, obtiveram um resultado positivo com mosquitos infectados 4 dias antes. Embora não conseguissem esclarecer definitivamente a questão, parece que, dependendo de futuras verificações, se pode admittir a possibilidade de os

mosquitos se tornarem infectantes antes daquelle periodo, acceito geralmente como limite minimo, de accordo com os trabalhos antigos.

O mosquito, uma vez infectado, continua infectante durante toda a sua vida. As experiencias de transmissão experimental do virus americano foram feitas entre nós principalmente por Aragão, no Rio, e Davis e Shannon, na Bahia.

A quantidade do virus no *Aëdes* infectado é bastante grande. Aragão e Costa Lima tomaram 3 mosquitos infectados, emulsionaram-nos em 10 cc. de agua distillada e depois levaram esta diluição até 1.000.000, conseguindo ainda assim obter a infecção do *Macacus rhesus.*

A transmissão hereditaria do virus pelos *A. aegypti* não é provavel, de accordo com verificações feitas, entre outros, por C. B. Philip.

2.° - Transmissão por outros mosquitos alem do *Aëdes aegypti.*

Bauer procurou verificar a possibilidade da transmissão do virus por outras especies de mosquitos pertencentes ao genero *Aëdes* e a diversos outros, commummente encontrados na Africa. Verificou que o *Aëdes luteocephalus* e o *Aëdes apicoannulatus* transmittem o virus da febre amarella da mesma forma que o *Aëdes aegypti.*

Com um lote de *Eretmopotides chrysogaster* infectado transmittiu a infecção a um *rhesus* normal; com outro lote dos mesmos mosquitos já não aconteceu tal, conseguindo somente infectar *rhesus* quando os inoculou com emulsão de mosquitos. A infecção assim determinada teve uma incubação mais longa, de 10 dias, mas as lesões histo-pathologicas foram identicas ás que se observam na febre amarella experimental.

Não deixa, pois, de ser possivel a infecção e transmissibilidade do virus por mosquitos pertencentes a outros generos além do *Aëdes.* Mais provavelmente deverão agir apenas como possiveis vehiculadores do virus, transmittindo-o pelas fezes, como acontece com o *Aëdes aegypti* e outros hematophagos, taes como o percevejo.

Mais recentemente, Davis e Shannon publicaram os seus resultados obtidos na Bahia: conseguiram a transmissão do virus de macaco a macaco pela picada do *Aëdes (Ochlerolatus) scapularis;* com o *Aëdes (Ochlerolatus) serratus,* provocaram a infecção pela injecção da emulsão de mosquitos e com o *Aëdes (Taeniorrhynchus) taeniorrynchus,* nas mesmas condições, uma infecção benigna. Com o *Culex quinquefasciatus (C. fatigans),* tanto a picada como a inoculação dos mosquitos infectados não provoca a infecção, mas alguns dos macacos mostraram-se relativamente immunizados em relação a inoculação posterior do virus activo.

Acreditamos que, conforme acontece com outros insectos hematophagos (o percevejo, por exemplo), muitos mosquitos, além do *Aëdes,* sejam possiveis vehiculadores do virus, eliminando-o com as fezes, que, assim seriam infectantes. A infecção por esse mechanismo, embora possivel, deve ser provavelmente rara em condições naturaes.

3.° - Transmissão pelas fezes de mosquitos (*Aëdes aegypti*) infectados.

Aragão e Costa Lima verificaram que as dejecções dos mosquitos infectam quando elles já são infectantes pelas suas picadas. Como pode acontecer com as picadas, as dejecções nem sempre determinam a morte, mas sim a infecção, quer benigna, quer grave.

Verificaram estes scientistas patricios que as dejecções de mosquitos infectados, depositadas sobre a pelle ou na conjunctiva ocular, intactas, tambem infectam o *Macacus rhesus;* observaram ainda que os excreta se mostravam infectantes depois de 5 e 7 dias da picada do mosquito em animal doente, acreditando que isto possa dar-se até mais cedo.

Aragão e Costa Lima, lançando mão de uma technica especial e delicada, verificaram ainda que a haemolympha colhida na camara pericardica de mosquitos infectados é tambem infectante, ao contrario do que Hindle havia concluido de suas experiencias. Assim, pois, antes de chegar ás glandulas salivares e poder ser transmittido pela picada, o virus do tubo digestivo passa para a cavidade celomica do mosquito.

4.° - Possibilidades da passagem do virus de mosquito a mosquito e infecção do Aëdes macho.

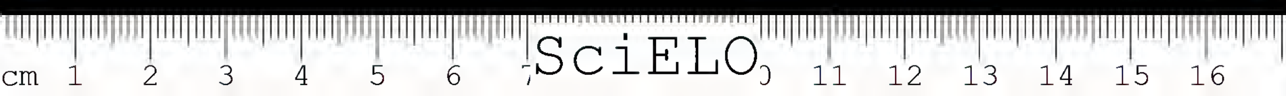
Numa serie de experiencias interessantes e de grande valor pelas suas consequencias praticas, Aragão e Costa Lima verificaram ainda ser possivel a infecção de *Aëdes* machos, addicionando um pouco de mel a sangue desfibrinado de um *rhesus* infectado e dando-lhes a mistura como alimento. A emulsão de mosquitos assim alimentados, feita no fim de 12 dias, provocou a infecção num *rhesus* normal.

Observaram ainda, ao cabo de alguns dias, a infecção adquirida por *Aëdes* machos normaes, collocados numa pequena gaiola de vidro com femeas infectadas, porquanto, emulsionados os machos e inoculados num *rhesus*, lhe provocaram a infecção typica amarillica. Tambem femeas normaes collocadas em gaiola contendo machos infectados, acabaram por se infectar e foram capazes de transmittir o virus ao *Macacus rhesus.*

Assim se evidencia a possibilidade da passagem do virus de mosquito a mosquito, sem necessidade da passagem pelo homem, o que é de grande importancia sob o ponto de vista epidemiologico.

5.° - Experiencias com percevejos. Transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de percevejos infectados.

Desde que iniciámos os nossos estudos experimentaes sobre a febre amarella, entre os problemas que tinhamos em vista verificar, estava o da possibilidade da transmissão experimental do virus por outros intermediarios, além do *Aëdes aegypti.* Esta possibilidade se justificava por certos factos epidemiologicos muitas vezes observados em surtos de febre amarella. Entre os possiveis vehi-



culadores do virus, chamou-nos a attenção, em primeiro lugar, o percevejo da cama, *Cimex lectularius*. Estes hemipteros sugadores de sangue têm sido responsabilizados pela transmissão dos agentes etiologicos de varias enfermidades; essa transmissão, por via de regra, se faz por meio das fezes dos insectos infectados, quando depositadas sobre a pelle ou mucosas de animaes ou individuos sãos.

Pareceu-nos, pois, de grande importancia verificar si o virus da febre amarella poderia tambem atravessar o tubo gastro-intestinal do percevejo, tornando seus excreta infectantes; isto, principalmente porque se sabe que esse virus pode atravessar a pelle e as mucosas. Desde que fosse verificado o facto, os percevejos se tornariam tambem dignos dos cuidados da prophylaxia amarillica.

A picada de um percevejo dura geralmente uns 3 minutos e é acompanhada por phenomenos reaccionarios, muitas vezes violentos, variaveis segundo a susceptibilidade individual. Após a picada, observa-se commummente, no homem, uma papula esbranquiçada de 2 millimetros de diametro, envolvida por uma zona de vaso-dilatação de 15 millimetros (Brumpt).

Muitas vezes, depois de alimentado, o percevejo defeca no lugar da picada ou em suas proximidades, facto esse verificado frequentemente nas nossas experiencias.

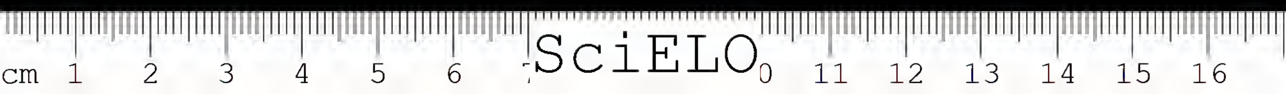
Na hypothese de um percevejo ter picado um doente nos tres primeiros dias da infecção, poderia dar-se o seguinte: muitos dias depois, em uma nova alimentação, feita em individuo são, o percevejo poderia, uma vez cheio, depositar o virus com as fezes emittidas: esse virus teria facilidade em penetrar através da pelle em virtude das condições reaccionarias locaes, occasionadas pela propria picada, e sobretudo, pelo facto de poder o material depositado ser esfregado pela propria pessôa ao coçar-se por causa da irritação sentida. Além da possibilidade assignalada que tornaria mais provavel a infecção, a simples existencia de excreta infectantes no leito de uma pessôa não eliminaria de todo tal possibilidade. Para a verificação experimental destes factos fizemos uma serie de experiencias que descrevemos a seguir:

Em 27-VI-1929 dois percevejos (*Cimex lectularius*) (*) foram alimentados no *Macacus rhesus* 38, que estava infectado e em periodo de reacção febril. A evolução da infecção do *rhesus* 38 foi a que se vê no graphico 11. Depois de cheios, os insectos foram retirados e collocados num pequeno tubo esterilizado. No fim de 24 horas, depois de removidos os percevejos para outro tubo, as fezes por elles depositadas, facilmente visiveis nas paredes do tubinho, foram emulsio-

---

(*) Informou-nos, posteriormente, o distincto collega dr. Cesar Pinto da existencia de outra especie de percevejo de cama commum na Capital Federal; trata-se do *Cimex hemipterus*.

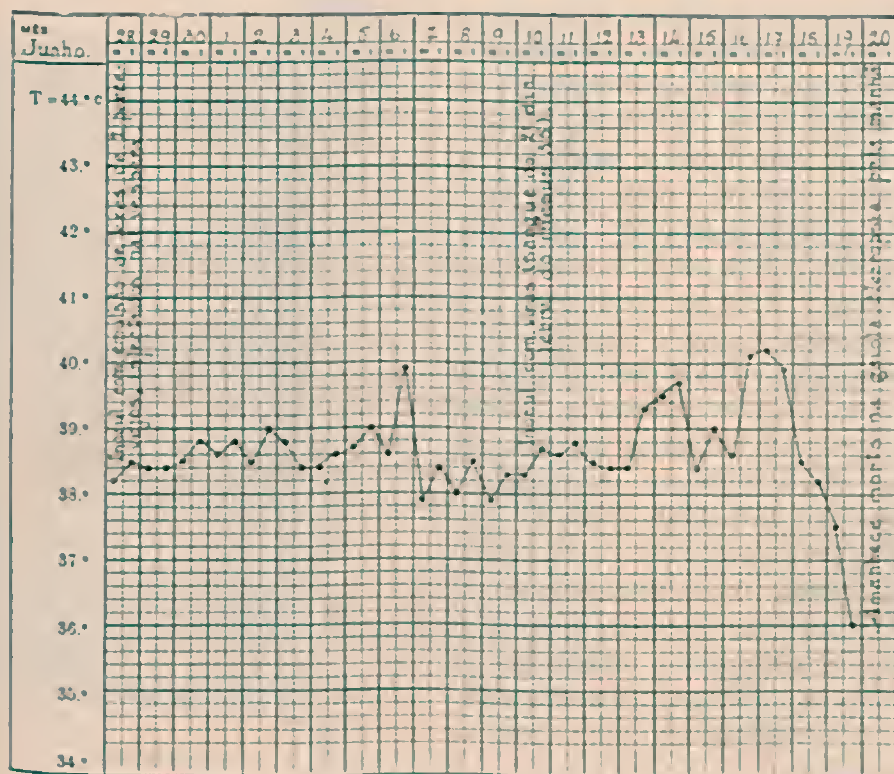
Os percevejos que utilizámos nas experiencias foram oriundos, no inicio, de pequena colheita feita no albergue nocturno e depois com insectos creados no laboratorio. Ignorando, na occasião, a existencia dessa outra especie entre nós, não procuramos fazer, por intermedio de especialistas no assumpto, a identificação rigorosa da especie por nós utilizada, o que, em todo caso, é de interesse secundario.



nadas em agua physiologica e a emulsão inoculada num *rhesus* normal. Isto foi repetido no fim de 12, 22 e 35 dias depois da picada infectante. Tendo morrido um dos insectos no 28.º dia, foi todo elle emulsionado e juntamente inoculado. Neste periodo de tempo os percevejos foram alimentados por 2 vezes em macacos normaes.

Experiencia I. - Em 28-VI-1929, isto é, no dia seguinte á alimentação infectante, os excreta encontrados no tubo foram emulsionados e inoculados no *Macacus*

Macacus rhesus N.º 39
(1929)



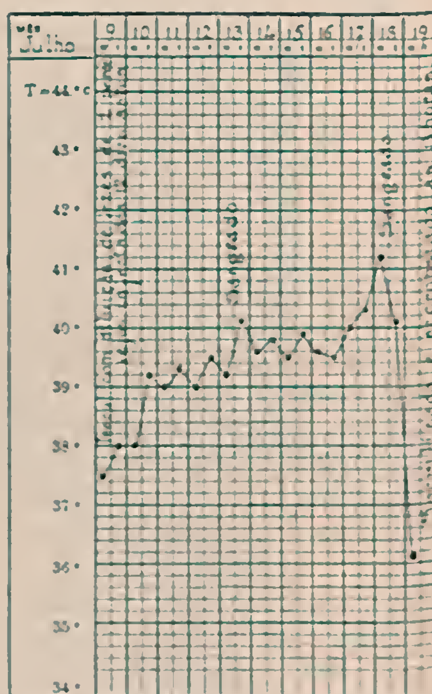
Graphico 35

rhesus 39. Como consequencia da injecção o *rhesus* não apresentou reacção febril, a não ser num dia apenas, o que se poderá attribuir á excitação produzida pela captura. Decorridos 12 dias, o *rhesus* 39 foi inoculado com o virus africano activo (sangue do *rhesus* 35, colhido no 2.º dia de febre). Como consequencia desta segunda injecção, o *rhesus* apresentou uma typica infecção amarillica, morrendo em 9 dias. O graphico 35 mostra as reacções deste macaco, consequentes ás inoculações recebidas.

Nestas condições, verifica-se que neste periodo de tempo, 24 horas, o virus ainda não havia começado a ser eliminado pelas fezes do insecto; isto porque não só não provocou a infecção de um *rhesus*, como não lhe determinou immunidade em relação a uma injecção posterior do virus activo. As dejecções existentes no tubinho nestas primeiras 24 horas eram, pois, oriundas de alimentação anterior, e já estavam na extremidade final do tubo intestinal, sendo eliminadas nesse decurso.

Experiencia II. - Em 9-VII-1929, o *Macacus rhesus* 43 foi inoculado com fezes dos dois percevejos, emittidas depois do 2.° até o 12.° dia em seguida á alimentação infectante. Os resultados desta experiencia foram objecto de uma nota preliminar que publicamos e são os seguintes: o *Macacus rhesus* 43 apresentou uma infecção amarillica clinicamente caracteristica e com confirmação histo-pathologica. Após 3 dias de incubação teve inicio o periodo de reacção febril, attingindo a temperatura a 40°,1 em 13-VII-1929, mantendo-se acima do normal para se elevar a 41°,2 em 18-VII-1929 pela manhã, 40°,1 á tarde e cahir para 36°,1 pela manhã de 19-VII-1929. O graphico 36 mostra a curva thermica do macaco. Nessa occasião, o animal apresentou-se triste, não se alimentou, supportando-se em pé com difficuldade e não se mostrando em condições de resistir durante muitas horas. Foi sacrificado e necropsiado nesse dia. Macroscopicamente os orgãos apresentavam o aspecto que se encontra na infecção experimental, o que foi confirmado pelo exame histo-pathologico do figado.

Macacus rhesus N.° 43
(1929)



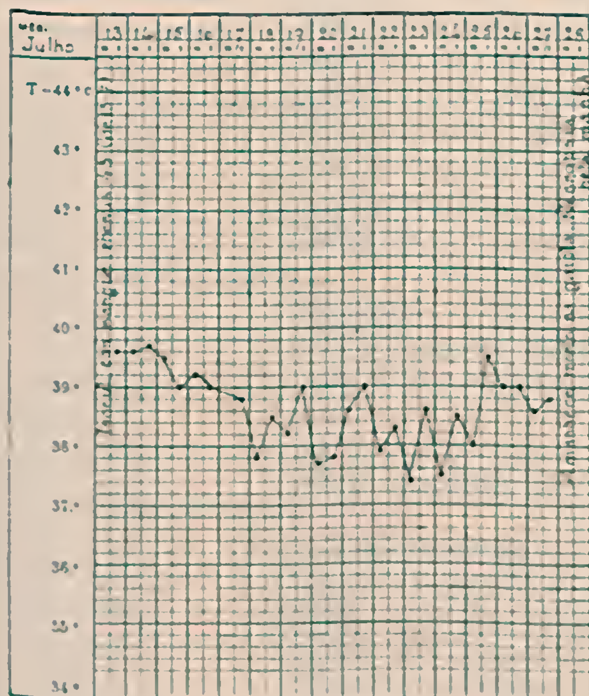
Graphico 36

O *Macacus rhesus* 43, nos dias 13 e 18-VII-1929, quando a temperatura esteve mais elevada, foi sangrado no coração, sendo com o sangue inoculados os *rhesus* 45 e 49. Tambem com emulsão de um pedaço do figado foi inoculado o *rhesus* 53, em 19-VII-1929. Os resultados destas inoculações, que demonstrariam tambem a infecção amarillica do *rhesus* 43, foram os seguintes:

Rhesus 45 (graphico 37), inoculado com sangue em 13-VII-29, apresentou uma infecção clinicamente atypica, não apresentando reacção febril nem outros symptomas, porém morreu durante a noite de 27 para 28-VII-1929. O exame histo-pathologico do figado mostrou lesões discretas, porém indicadoras da infecção.

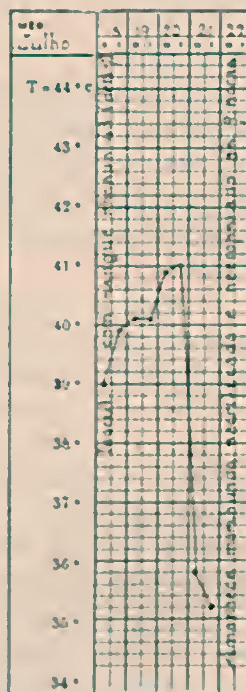
Rhesus 49 (graphico 38), inoculado no peritonio com o sangue de 18-VII-1929, da sangria do *rhesus* 43 quando este apresentava a temperatura de 41°,2: no dia seguinte a temperatura deste *rhesus* attingiu e se manteve em 40°,1; em 20-VII-29 attingiu 40°,9 pela manhã e 41° á tarde; em 21-VII-1929, pela manhã, a temperatura cahiu a 35°,8, apresentando o animal o aspecto clinico caracteristico da infecção; ás 14 horas deste dia, a temperatura estava em 35°,2 quando o animal foi sacrificado e necropsiado. O exame histo-pathologico confirmou o infecção amarillica.

Macacus rhesus N.° 45
(1929)



Graphico 37

Macacus rhesus N.° 49
(1929)



Graphico 38

Rhesus 53 (graphico 39), inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 43 em 19-VII-1929. A infecção deste macaco teve evolução clinica tambem caracteristica, morrendo o animal em 23-VII-1929 e sendo a infecção confirmada pelo exame histo-pathologico.

Verifica-se assim que os percevejos infectados por meio da alimentação em *Macacus rhesus* infectado, eliminaram o virus amarillico juntamente com as dejecções depois de 24 horas até o 12.° dia; esse virus foi capaz de infectar um *rhesus* normal, de modo perfeitamente caracteristico, e produzir passagens positivas em novos macacos, tanto com a inoculação do sangue, como com a emulsão de figado.

Não se pode, pela experiencia acima, dizer quando começou a eliminação do virus; apenas que elle persiste activo desde o 2.º até o 12.º dias que se seguiram á alimentação infectante, quando accumulado nas fezes emittidas pelos percevejos.

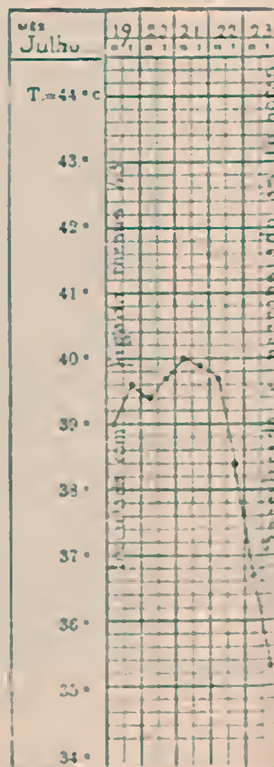
Experiencia III. - Em 19-VII-1929, removidos os percevejos, as fezes accumuladas do 13.º ao 22.º dias após a alimentação infectante foram emulsionadas em 2 cc. de agua physiologica. Metade da diluição (1 cc.) foi inoculada debaixo da pelle do *Macacus rhesus* 51 e a outra metade (1 cc.) foi depositada aos poucos e esfregada com luva de borracha na pelle do abdome, raspada com navalha, do *Macacus rhesus* 52. O *rhesus* 51 não apresentou reacção thermica caracteristica da infecção, pelo que, em 6-VIII-1929, foi inoculado com o virus activo (emulsão de figado do *rhesus* 62). Esta 2.ª injecção determinou reacção thermica que se iniciou no 4.º dia, perdurou, menos accentuada, ainda no dia seguinte e manteve-se depois em media normal, resistindo afinal o macaco.

O *Macacus rhesus* 52 que recebeu a emulsão das fezes através da pelle, apresentou reacção local intensa e, talvez por este motivo, tambem reacção thermica, mas não caracteristica, no fim de alguns dias.

Em 6-VIII-1929 foi tambem inoculado com o virus activo (figado do *rhesus* 62), tendo uma typica infecção amarillica.

Desta maneira, talvez o virus porventura accumulado nas fezes dos percevejos do 13.º ao 22.º dia estivesse attenuado no fim desse periodo, ou a quantidade depositada então fosse tão pequena que apenas talvez conseguisse augmentar a resistencia do *rhesus*, inoculado subcutaneamente, em relação a nova inoculação virulenta feita 18 dias depois; o mesmo já não aconteceu com o outro animal, inoculado através da pelle, e neste caso é provavel que tenha concorrido a consequente reacção inflammatoria local.

Macacus rhesus N.º 53 (1929)



Graphico 39

Experiencia IV. - Em 20-VII-1929, os percevejos foram alimentados pela 2.ª vez, ou sejam 23 dias após a alimentação infectante e 11 da ultima alimentação. Foi utilizado o *rhesus* normal 54. Um dos insectos, depois de cheio, defecou na parede abdominal nas proximidades do ponto da picada. A gotticula escura de fezes foi ahi deixada, sem manobra alguma, sendo o animal collocado na gaiola. Muitos dias depois, em 7 e 9-VIII-1929, a temperatura do *rhesus* subiu a 40°,3

e 40° respectivamente. Em 12-VIII-1929 o animal foi sangrado, sendo inoculado o *rhesus* 64.

A temperatura do *rhesus* 54 manteve-se em media mais ou menos normal. O mesmo aconteceu com o *rhesus* 64, inoculado com o seu sangue de 12-VIII-1929. Este macaco, depois de 18 dias, foi inoculado com o virus (emulsão de figado do *rhesus* 66); teve uma infecção caracteristica e morreu 5 dias depois.

Nestas condições, as fezes eliminadas pelo percevejo no 23.° dia após a picada infectante já não continham virus, ou, si o continham, não conseguiram determinar a infecção de um macaco quando depositadas sobre a pelle.

Este resultado parece justificar a hypothese formulada no commentario da experiencia III, de ter sido o virus eliminado somente no inicio do periodo comprehendido entre o 13.° e o 22.° dia da picada infectante.

Experiencia V e VI. - Nestas experiencias os *rhesus* foram inoculados respectivamente com emulsão de um percevejo total, que amanheceu morto no 28.° dia após a picada infectante, e com diluição de fezes emittidas e accumuladas depois do 23.° dia, sendo que, por um dos insectos, até o 35.° dia depois. Foram utilizados os *rhesus* 57 e 61 que não apresentavam clinicamente reacção caracteristica de infecção especifica, embora o inoculado com a emulsão do percevejo tenha tido sua temperatura elevada a 40° algumas vezes.

Numa nova serie de experiencias com percevejos foram inoculados mais dois *rhesus*. Seis percevejos foram alimentados em 28-VIII-1929 no *Macacus rhesus* 66, no 2.° dia de reacção febril, e, immediatamente depois de cheios, collocados num tubo.

Experiencia VII. - Neste mesmo dia, as fezes eliminadas nas primeiras 4 horas que se seguiram á alimentação infectante foram, depois de diluidas, inoculadas no *rhesus* 68, que não apresentou durante varios dias reacção thermica caracteristica. Em 11-IX-1929, foi elle de novo inoculado com as dejecções dos mesmos percevejos accumuladas no tubinho durante os 14 dias decorridos. Esse macaco durante muitos dias não apresentou reacção febril; no fim de 30 dias (11-X-1929) da segunda inoculação a temperatura subiu a 40°,5 á tarde; no dia seguinte foi de 39°,7 e 39°,8 para subir no immediato a 40° e 40°,2, mantendo-se depois em media mais ou menos normal durante varios dias. Em 22-X-1929 o *rhesus* 68 foi inoculado com o virus activo (emulsão de figado do *rhesus* 80), não apresentando reacção febril e, assim, mostrando-se immunizado em relação ao virus.

Verifica-se, pois, que o virus não existente nas fezes emittidas pelos percevejos nas primeiras horas que se seguiram á alimentação infectante, existia nas dejecções accumuladas durante 14 dias, provocando uma infecção benigna depois de um longo periodo de inoculação, infecção que foi confirmada pela immunidade do *rhesus* em relação a nova inoculação de virus activo.

Experiencia VIII. - Em 11-IX-1929 os seis percevejos foram alimentados em outro *rhesus* e, uma vez cheios, immediatamente retirados e collocados num tu-

binho. As fezes emittidas nas 2 horas que se seguiram a esta alimentação, e que, por conseguinte, foram eliminadas pelos insectos no 15.º dia após a picada infectante, e recentes, foram diluidas e inoculadas no *Macacus rhesus* 70. Este macaco não apresentou reacção febril. Em 22-X-1929 foi inoculado com o virus activo (emulsão de figado do *rhesus* 80); não apresentou reacção, mostrando-se immunizado em relação á infecção. Logo, neste prazo de 15 dias, o virus foi eliminado em pequena quantidade, tanto que não provocou a infecção, mesmo ligeira, e sim a immunidade do rhesus. E' provavel que este prazo esteja no limite da eliminação do virus após a alimentação infectante, iniciando-se depois do 2.º dia.

Pelas experiencias descriptas é evidente que o virus da febre amarella é capaz de atravessar o tubo gastro-intestinal de um insecto hematophago, o percevejo (*Cimex lectularius*), quando absorvido pela picada em um animal infectado e ser eliminado pelas fezes do insecto depois de um certo prazo, tornando-as infectantes para animaes sensiveis normaes. O tempo de duração da eliminação do virus não ultrapassa, talvez, 15 dias, dependendo do tamanho do insecto, quantidade de sangue virulento ingerido, concentração do virus nelle contido, e outras condições. Esta eliminação será provavelmente constante si as subsequentes alimentações forem tambem em animaes infectados em periodo favoravel.

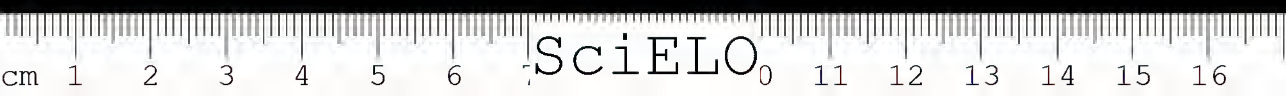
Da mesma forma que com os mosquitos, deverá acontecer com os percevejos; quando a infecção não se dá pela picada ou com as fezes é porque falta concentração ao virus ou lhe são necessarios outros factores ainda não perfeitamente determinados e a elle inherentes.

Vê-se, por todos esses ensaios feitos, que nem sempre é permittido tirar-se uma conclusão dos resultados negativos; o mesmo não acontece com os positivos, que devem ser tomados em consideração.

No organismo do percevejo o virus provavelmente não soffre qualquer evolução ou multiplicação; pode apenas atravessar o tubo gastro-intestinal do insecto e ser eliminado ainda activo; neste caso, o percevejo é um mero vehiculador. Isto, provavelmente, poderá acontecer com outros insectos hematophagos, devendo ser excepcional a infecção por esse mechanismo, nas condições naturaes.

Entretanto, sob o ponto de vista pratico, os nossos resultados não são destituidos de importancia. O facto já verificado de que o virus amarillico pode atravessar a pelle, principalmente se esta foi irritada, e que o percevejo, depois de cheio, geralmente elimina fezes, que podem ser infectantes por alimentação anterior, no periodo propicio, em individuo doente, indica que os serviços de prophylaxia amarillica não devem descuidar estes insectos, por ventura existentes nas habitações de onde são removidos doentes de febre amarella.

Aragão e Aragão e Costa Lima fizeram verificações sobre a possibilidade da passagem do virus de mosquito a mosquito e tambem da infectuosidade das fezes dos *Aëdes aegypti* infectados; nós verificámos a possibilidade de ser o virus amarillico eliminado pelas fezes de percevejos infectados; estas observações podem explicar certos factos epidemiologicos, commummente observados na febre amarella, taes como o apparecimento de novos casos em focos expur-



gados, desde que os processos empregados auctorizem a suppor que, em certas circunstancias, os percevejos possam resistir á desinfecção ou encontrem condições mais favoraveis a uma sobrevivencia.

6.° - Possibilidades da existencia de depositarios do virus amarillico entre os animaes domesticos.

O problema de depositarios de virus é dos mais importantes sob o ponto de vista epidemiologico. A experiencia tendente a verificar si certos animaes domesticos podem ser depositarios do virus da febre amarella foi-nos suggerida pelo dr. Arthur Neiva.

Fizemos a respeito, com o cachorro, algumas experiencias preliminares que, embora o autorizassem, não puderam ser continuadas na occasião por se ter esgotado o stock de animaes de que então dispunhamos.

Posteriormente, tendo recebido mais alguns macacos, realizámos com gatos nova serie de experiencias, cujos resultados foram mais interessantes, como se verá opportunamente.

a) *Experiencias com o cão.*

Mostraremos a seguir, de um modo resumido, os nossos resultados preliminares obtidos com o cachorro.

As experiencias foram realizadas em uma cadella que soffreu 2 inoculações de virus amarillico (sangue e emulsão de figado de *rhesus* infectado), sendo sangrada em differentes intervallos e o sangue inoculado em *Macacus rhesus* normaes. Em 13-VII-1929 a cadella foi inoculada, sob a pelle, com 10 cc. de sangue desfibrinado do *Macacus rhesus* 44, sangrado em periodo de reacção febril.

Experiencia I. - Em 16-VII-1929, isto é, após 3 dias, a cadella foi sangrada no coração e 5 cc. de sangue foram immediatamente inoculados debaixo da pelle do *rhesus* 47.

A temperatura mais elevada que teve este macaco foi de 39°,9, no 4.° dia após a injecção, mantendo-se depois em media mais ou menos normal. Decorridos 21 dias, em 6-VIII-1929, o *rhesus* 47 foi inoculado com o virus amarillico secco e convenientemente conservado (figado do *rhesus* 62) depois de emulsionado. Este virus era seguramente activo, pois causou a infecção typica e morte, em 8 dias, do *rhesus* 66 inoculado em 22-VII-1929, como testemunha.

Como consequencia da inoculação virulenta, o *rhesus* 47 não apresentou reacção febril; o maximo da temperatura attingiu 39°,8, mantendo-se geralmente em media normal. Esse macaco, no fim de quasi um mez de observação, começou a emagrecer muito, apresentou diarrhéa, iniciando-se elevações thermicas vesperaes, o que nos fez pensar numa infecção tuberculosa. Foi sacrificado, observando-se pela necropsia o aspecto de uma tuberculose mesenterica, com generalização, confirmada pela presença de bacillos alcool-acido-resistentes em esfregaços de ganglios mesentericos caseosos, pelos nodulos do figado e pela inoculação em cobaia.

O exame histo-pathologico do figado não mostrou as lesões determinadas pelo virus amarillico.

O *rhesus* 47, inoculado com o sangue da cadella, mostrou-se, pois, immunizado em relação ao virus amarillico, indicando a presença deste no sangue do animal refractario que o havia recebido 3 dias antes. Nessas condições, o virus não provocou uma infecção apparente, porem a immunidade do animal sensivel ao virus.

Este resultado não deve ser explicado por uma possivel immunização passiva do *rhesus* pelo sangue do cachorro previamente inoculado com o virus. Isto porque após somente 3 dias não haveria tempo sufficiente para a formação de anticorpos em porção tal que produzisse esse effeito na dose inoculada e, em 2.° logar, mesmo admittida esta hypothese, a immunidade passiva já não deveria provavelmente perdurar depois do 20.° dia, quando a injecção do virus foi feita.

Experiencia II. - Em 25-VII-1929, isto é, 12 dias após ter sido inoculada com virus, a cadella foi de novo sangrada, sendo 5 cc. de sangue immediatamente inoculados no peritonio do *Macacus rhesus* 56. Como consequencia da injecção, a temperatura do *rhesus* não se modificou da media normal; apenas no 15° dia attingiu 39°,8, voltando á media. Em 12-VIII-1929 foi o *rhesus* inoculado com o virus (emulsão de figado do *rhesus* 52) e em 30-VIII-1929 novamente (emulsão de figado do *rhesus* 66). A temperatura mais elevada que teve este macaco foi de 39°,8, mantendo-se depois em media mais ou menos normal. Nesta experiencia, a immunidade do macaco em relação á 2.ª inoculação do virus (seguramente activo, com testemunha positiva) poderá ser attribuida á anteriormente feita, julgando-se então que o virus estivesse nella attenuado, razão por que a experiencia não é concludente.

Em 6-VIII-1929 a cadella foi de novo inoculada com o virus amarillico (emulsão fresca de figado do *rhesus* 62) para repetição das experiencias, na hypothese do primitivo virus (sangue) não se ter apresentado sufficientemente activo. A inoculação foi feita debaixo da pelle e, dias depois, notou-se formação de um abcesso suppurado, cuja abertura foi provocada pelo animal.

Experiencia III. - Em 10-VIII-1929, isto é, 4 dias após a inoculação do virus, e antes de se notar a suppuração, a cadella foi sangrada no coração e 5 cc. de sangue immediatamente inoculados no peritonio do *Macacus rhesus* 63. Este macaco, antes da inoculação, apresentava 38°,5. Sua temperatura subiu a 39°,9 na tarde do 3.° dia: no 4.° dia teve 39°,8 e 40°,1 á tarde; no 5.° dia, 39°,7 e 40° á tarde; no 6.° dia 39°,6 e 39°,3 á tarde; no 7.° dia 39° e 39°,4 mantendo-se nos dias seguintes nesta media, attingindo uma vez, dias depois, 40°,3.

Em 30-VIII-1929, isto é, 20 dias depois de ter sido inoculado com o sangue do cachorro, é o *rhesus* 63 inoculado com o virus amarillico (emulsão de figado do *rhesus* 66), seguramente activo, pois provocou na mesma dose a infecção typica e a morte, em 5 dias, do *rhesus* 69, testemunha.

Como consequencia desta inoculação virulenta, o *rhesus* não apresentou reacção que indicasse a infecção e continuou em boas condições, mostrando-se,

pois, immunizado em relação ao virus activo. Esta immunidade, pelas considerações já feitas, somente poderá ser attribuida a uma immunização activa pelo virus existente no sangue do cachorro. Este virus provocou no macaco uma reacção febril, embora não determinasse uma infecção mortal.

Infelizmente a falta de animaes sensiveis não nos permittiu a inoculação comprovadora da existencia do virus no sangue do macaco, durante o periodo da reacção febril, consequente á inoculação do sangue do cachorro.

Experiencia IV. - Em 16-VIII-1929, isto é, 10 dias após a 2.ª inoculação do virus, a cadella foi de novo sangrada no coração e 5 cc. de sangue foram immediatamente inoculados no peritonio do *Macacus rhesus* 65. Este macaco não apresentou reacção. Em 30-VIII-1929, ou sejam 14 dias após, foi inoculado com o virus (emulsão de figado do *rhesus* 66). No 3.º dia após esta inoculação a temperatura do macaco attingiu, á tarde, 40°,2; no 4.º dia, 40°,4 e 40°; no 5.º dia 39°,7 e 39°,8; no 6.º 39°,2 e 39°,6, mantendo-se depois nesta media ou pouco abaixo, tendo havido, após varios dias, raras ascenções seguidas de volta ao normal.

A segunda inoculação parece, pois, ter provocado no macaco uma infecção amarillica não mortal, embora não tenha sido feita passagem para outro animal pelo motivo já exposto.

Assim sendo, o virus porventura existente no sangue da cadella no 10.º dia após a injecção, já estaria destruido ou existiria em tão pequena quantidade, que se mostrou incapaz de provocar, pelo menos, uma immunidade completa do *rhesus*. Talvez, para explicação deste resultado, convenha recordar que a 2.ª inoculação do cachorro foi feita com emulsão de figado e por via sub-cutanea e que no lugar da inoculação houve, dias após, formação de um abcesso, que suppurou, sendo o local constantemente lambido pelo animal, o que deu em resultado uma ulceração extensa na zona. E' provavel, por isto, que a reacção intensa e suppuração tenham contribuido para a destruição do virus no fim dos 10 dias, o que não havia ainda acontecido em 4 dias, quando certa quantidade já entrára para a corrente circulatoria, contribuindo para o resultado da experiencia III.

b) *Experiencias com gatos.*

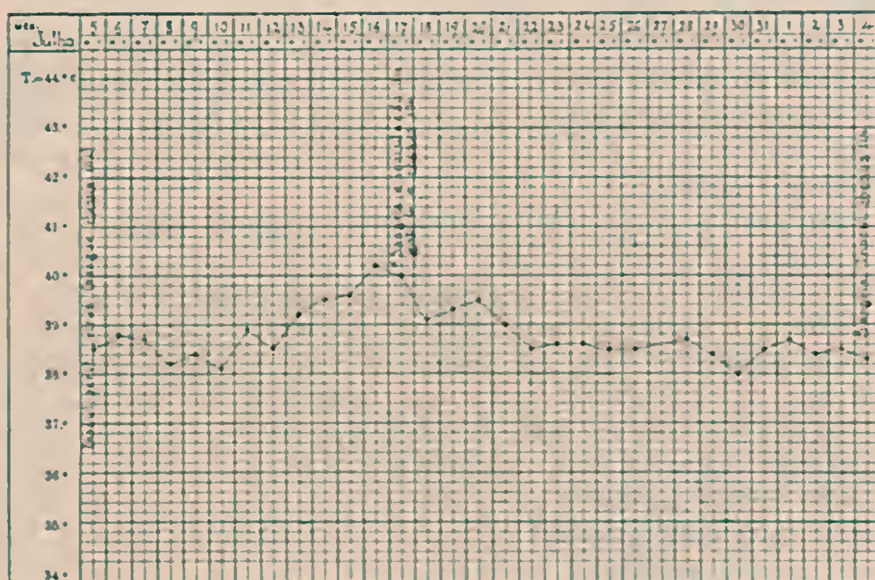
Bem mais interessantes e demonstrativas foram as experiencias que realizámos ultimamente com gatos e que aqui serão apenas resumidas, devendo constituir objecto de um trabalho mais minucioso a ser publicado opportunamente.

Experiencia I. - Em 5-VII-1930 foi inoculado o gato 1, por via peritoneal, com 2 cc. de sangue do *Macacus rhesus* 102, infectado com o virus amarillico e sangrado durante o periodo de reacção febril. No decurso da primeira semana o gato nada apresentou de anormal, sendo a temperatura rectal tomada diariamente ás 13 horas. No 8.º dia a temperatura foi de 39°,2; no 9.º dia, de 39°,5; no 10.º, de 39°,6; no 11.º, de 40°,2; no 12.º, de 40°,0; no 13.º, de 39°,1; no 14.º, de 39°,3; no 15.º, de 39°,5; no 16.º, de 39°,0; no 17.º, de 38°,5, mantendo-se depois nesta media normal durante longa observação, como melhor se vê pelo graphico 40.

Logo que a temperatura do gato começou a subir e quando se manteve elevada, nos 10.º, 11.º e 12.º dias principalmente, o animal apresentou-se doente, sempre triste, deitado num canto da gaiola e não procurou alimentar-se. Seu estado voltou ao habitual com a descida da temperatura á media normal.

No 12.º dia, com a temperatura de 40º, o gato foi sangrado no coração, retirando-se 20 cc. de sangue. Parte deste sangue foi desseccada e parte utilizada para semeaduras em differentes meios culturaes e inoculações no *Macacus rhesus* 106 e gato 4. No fim de 30 dias de inoculação, o gato 1 foi novamente sangrado, sendo inoculado o *rhesus* 114.

Gato N.º 1
(1930)



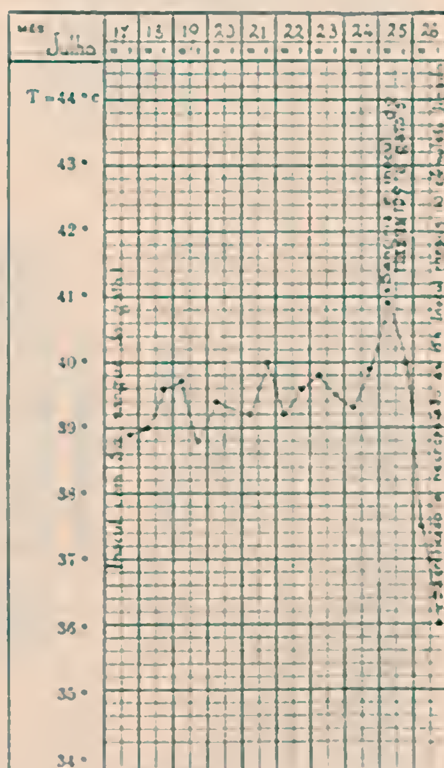
Graphico 40

Os resultados destas inoculações e as experiencias dellas decorrentes foram os seguintes:

Macacus rhesus 106 - Recebeu em 17-VII-1930, por via peritoneal, 5 cc. de sangue desfibrinado do gato 1, sangrado após 12 dias da sua inoculação com o virus amarillico. Como consequencia teve o macaco uma infecção amarillica caracteristica, morrendo em 9 dias (graphico 41). A infecção foi confirmada pelo exame histo-pathologico e pelas passagens nos *Macacus rhesus* 109 (inoculado, em 25-VII-1930, com 2cc. de sangue colhido durante a reacção febril e morto em 4 dias - graphico 42) e *Macacus rhesus* 110 (inoculado, em 26-VII-1930, com emulsão de figado e morto no 3.º dia - graphico 43).

Com 4 cc. de sangue desfibrinado do *rhesus* 106 foi tambem inoculado o gato 5, em 25-VII-1930. Este gato nada de anormal apresentou. No 11.º dia, em 5-VIII-1930, foi sangrado, sendo 5 cc. do sangue inoculado no *Macacus rhesus* 117, por via peritoneal. Este macaco não apresentou reacção febril, mas em 18-VIII-1930 a reacção do desvio de complemento, praticada com seu sôro, foi positiva (++) e, em 26-VIII-1930, inoculado com o virus activo, não reagiu, mostrando-se immunizado.

Macacus rhesus N.º 106
(1930)



Graphico 41

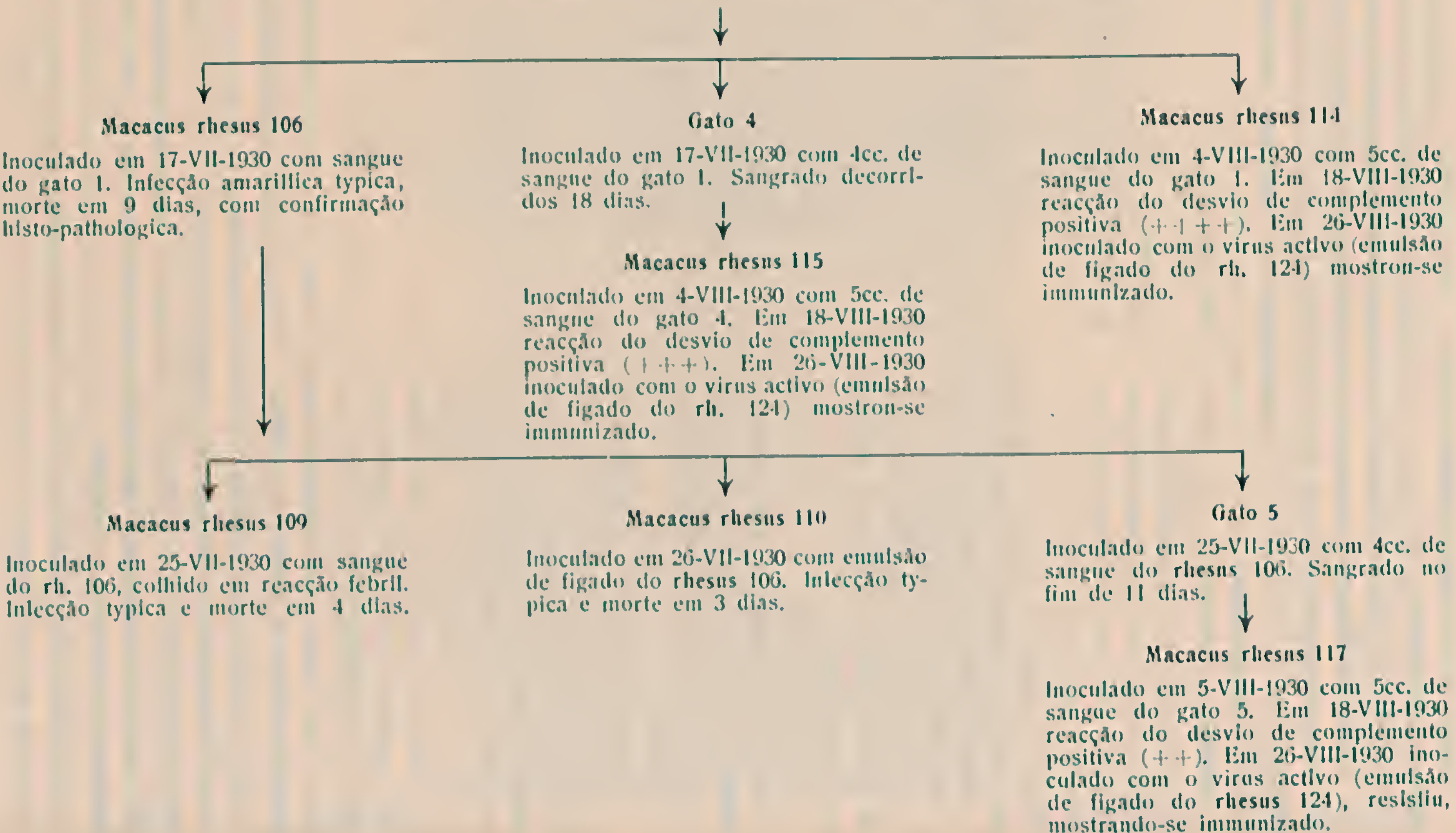
Gato 4 - Inoculado tambem em 17-VII-1930 com 4 cc. de sangue do gato I, colhido no 12.º dia. Não apresentou reacção febril. No fim de 18 dias, em 4-VIII-1930 foi sangrado, sendo inoculado o *Macacus rhesus* 115 com 5 cc. de sangue, por via peritoneal. Em 18-VIII-1930 a reacção do desvio de complemento com o sôro deste *rhesus* foi positiva (+++) e em 26-VIII-1930, inoculado com o virus activo, resistiu á infecção, mostrando-se immunizado.

Nestas condições, o virus, mesmo passando por 2 gatos, embora não determinasse uma infecção typica dos *rhesus*, foi ainda capaz de immunizal-os contra a infecção.

Macacus rhesus 114 - inoculado em 4-VIII-1930, isto é, depois de 30 dias da inoculação com o virus, com 5 cc. de sangue do gato I. Não apresentou reacção febril; em 18-VIII-1930, a reacção do desvio de complemento foi fortemente positiva (++++) e, em 26-VIII-1930, inoculado com o virus activo, mostrou-se immunizado. Isto revela que, ainda no fim desse prazo (como ao cabo de 12 dias), a presença do virus no sangue do gato embora incapaz de provocar a infecção typica, é sufficiente para immunizar o *rhesus* contra uma nova infecção experimental.

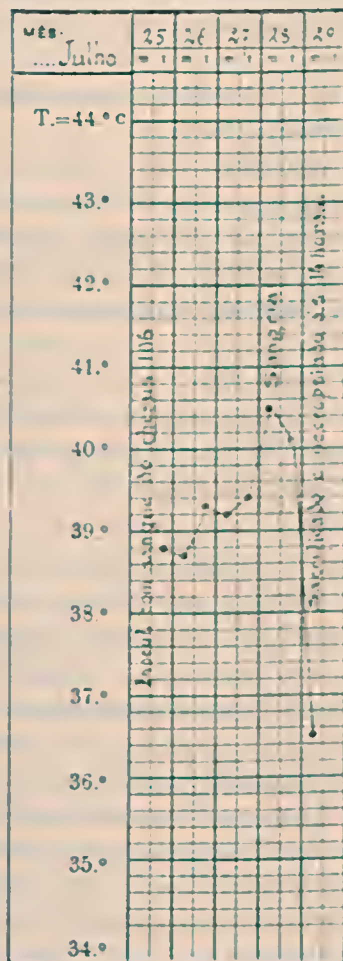
A difficuldade de obtenção de animaes de experimentação impediu-nos de determinar outros factos de interesse e tambem o tempo que o virus pode persistir, depois de 30 dias, no organismo do gato, para determinar, pelo menos, uma immunidade em relação á infecção.

O eschema junto mostra melhor os resultados até agora obtidos nesta primeira serie de experiencias:


Gato 1
Inoculação com o virus amarillico (2cc. sangue do rhesus 102) por via peritoneal, em 5-VII-1930. Sangrado no 12.º e 30.º após a inoculação. Apresentou reacção febril e outros symptomas durante certo periodo e volta ao estado normal.
Macacus rhesus 106
Inoculado em 17-VII-1930 com sangue do gato 1. Infecção amarillica typica, morte em 9 dias, com confirmação histo-pathologica.
Gato 4
Inoculado em 17-VII-1930 com 4cc. de sangue do gato 1. Sangrado decorridos 18 dias.
Macacus rhesus 115
Inoculado em 4-VIII-1930 com 5cc. de sangue do gato 4. Em 18-VIII-1930 reacção do desvio de complemento positiva (+++). Em 26-VIII-1930 inoculado com o virus activo (emulsão de figado do rh. 124) mostrou-se immunizado.
Macacus rhesus 114
Inoculado em 4-VIII-1930 com 5cc. de sangue do gato 1. Em 18-VIII-1930 reacção do desvio de complemento positiva (++++). Em 26-VIII-1930 inoculado com o virus activo (emulsão de figado do rh. 124) mostrou-se immunizado.
Macacus rhesus 109
Inoculado em 25-VII-1930 com sangue do rh. 106, colhido em reacção febril. Infecção typica e morte em 4 dias.
Macacus rhesus 110
Inoculado em 26-VII-1930 com emulsão de figado do rhesus 106. Infecção typica e morte em 3 dias.
Gato 5
Inoculado em 25-VII-1930 com 4cc. de sangue do rhesus 106. Sangrado no fim de 11 dias.
Macacus rhesus 117
Inoculado em 5-VIII-1930 com 5cc. de sangue do gato 5. Em 18-VIII-1930 reacção do desvio de complemento positiva (++). Em 26-VIII-1930 inoculado com o virus activo (emulsão de figado do rhesus 124), resistiu, mostrando-se immunizado.

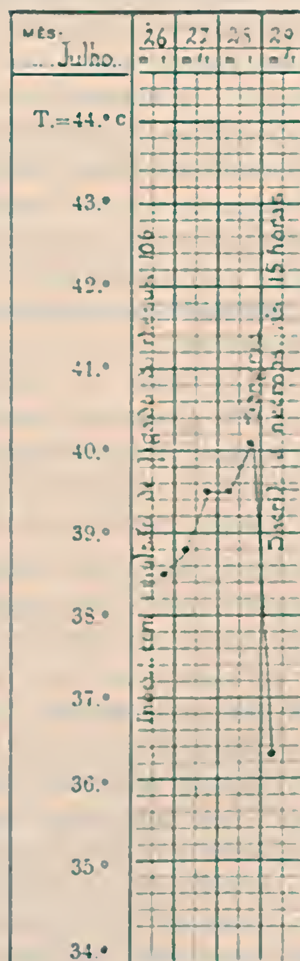
Interessantes tambem foram os resultados das semeaduras feitas com o sangue do gato I, colhido no 12.° dia, durante a reacção febril. Em meios anaerobios (caldo glycosado com pedaços de musculo cardiaco no fundo do tubo), obteve-se cultura pura de um *Corynebacterium*, dotado de propriedades interessantes e que

Macacus rhesus N.° 109
(1930)



Graphico 42

Macacus rhesus N.° 110
(1930)



Graphico 43

será descripto em capitulo especial. A este germe denominamos *Corynebacterium G1s*, indicando sua origem (sangue do gato 1).

Experiencia II. - Em 5-VII-1930 foi o gato 2 inoculado, por via sub-cutanea, com 2 cc. de sangue do *Macacus rhesus* 102, infectado com o virus amarillico e sangrado em reacção febril. Ao contrario do anterior, este gato não apresentou reacção febril; apezar disto, durante um certo numero de dias (em 17, 18 e 19-

VII-1930), correspondentes aos 12.°, 13.° e 14.° dias após a inoculação, elle se mostrou com aspecto de doente, triste, sempre deitado e sem se alimentar, voltando mais tarde ao normal. O aspecto de doente reappareceu, sem reacção febril, decorridos 28 dias da inoculação (em 2-VIII-1930), estado que se accentuou em 4-VIII-1930, quando se notou paresia do membro posterior direito e hypothermia (35°,5) pela manhã. Em vista destes symptomas, parecia que o gato succumbiria, de sorte que resolvémos esperar o exito fatal. Isto, porém, não occorreu, pois á tarde a temperatura era já de 38°,5 e, dentro de mais alguns dias, o gato readquiriu seu aspecto normal.

O gato 2 foi sangrado no 4.° e no 30.° dias após a inoculação, sendo com seu sangue inoculados respectivamente os *Macacus rhesus* 104 e 116.

Os resultados destas inoculações foram os seguintes:

Macacus rhesus 104 - Inoculado em 9-VII-1930 com 4 cc. de sangue do gato 2. Nada de anormal apresentou. Decorridos 20 dias, em 29-VII-1930, foi inoculado com o virus activo (2 cc. de sangue do *rhesus* 109). Como consequencia desta inoculação, nenhuma reacção apresentou, mostrando-se immunizado em relação ao virus.

Macacus rhesus 116 - Inoculado em 4-VIII-1930 com 5 cc. de sangue do gato 2. Não apresentou reacção febril. A reacção do desvio de complemento praticada em 18-VIII-1930, com o seu sôro foi positiva (+++) e, em 26-VIII-1930, inoculado com o virus activo (emulsão de figado do *rhesus* 124), não apresentou reacção, mostrando-se tambem immunizado.

Outras experiencias: Tambem em 5-VII-1930 foi inoculado o gato 3, por via cerebral, com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* 102, infectado pelo virus amarillico e sangrado em reacção febril. Por esta via o gato nada de anormal apparentemente apresentou, tanto em relação á temperatura, como ao seu aspecto. Por este motivo e pela escassez de animaes, não foram praticadas reinoculações.

Em 9-VIII-1930 foi inoculado o gato 7, por via peritoneal com 5 cc. de sangue do *Macacus rhesus* 118, infectado com virus amarillico neurotropico e da 3.ª passagem pelo camondongo branco. Este gato apresentou evidentes signaes de doente; desde o 2.° dia apresentou-se triste, não se alimentando, apenas bebendo agua repetidas vezes e com ligeira paresia dos membros posteriores. Este estado perdurou nos dias seguintes, e sua temperatura manteve-se mais baixa que a media geralmente observada nestes animaes. Somente em 16-VIII-1930 começou a alimentar-se e o seu estado a melhorar até a volta ao normal.

O gato 8, alimentado com figado de *rhesus* que succumbira da infecção amarillica, não apresentou reacção ou outro symptoma anormal, o mesmo acontecendo com o gato 9, inoculado com emulsão de cerebro dos camondongos brancos 4 e 5 (da 4.ª passagem do virus por este animal).

Estas experiencias, assim como outras realizadas com gatinhos recemnascidos (de 1, 6 e mais dias de idade), estão sendo continuadas e deverão ser relatadas em posterior publicação, se puderem ser proseguidas.

Discussão: As experiencias acima descriptas e seus resultados parecem indicar que o virus amarillico inoculado num animal domestico, que não lhe é sensivel, o cachorro, pode persistir em seu organismo, sendo capaz de, transferido novamente para um animal sensivel, o *Macacus rhesus*, provocar neste uma reacção thermica como se observa na infecção experimental; pode produzir tambem immunidade em relação a nova inoculação de virus seguramente activo. A reacção thermica mais ou menos caracteristica como consequencia da inoculação do sangue do cachorro assim tratado pode não existir, porém o *rhesus* com elle inoculado apresenta uma immunidade em relação a uma posterior inoculação do virus feita directamente.

Em todo caso, estes resultados preliminares permittem, em relação ao cão, a supposição de que este animal possa ser depositario do virus da febre amarella, durante um certo numero de dias.

Mais interessantes foram os resultados obtidos com o gato. Embora nenhum dos nossos animaes inoculados tenha succumbido á injecção do virus amarillico, alguns apresentaram symptomas clinicos e reacção febril (depois de certo periodo de incubação), em virtude dos quaes se poderia acreditar em sua sensibilidade ao virus.

Este persistiu no organismo do gato, sendo capaz de, no 12.º dia, provocar uma infecção amarillica caracteristica quando transferido para o *Macacus rhesus*, ou a immunidade deste macaco, quando inoculado nelle depois de decorridos 30 dias de sua permanencia no gato.

O virus poude ainda ser transportado de gato a gato e depois provocar, quando passado para o *rhesus*, a immunidade deste, manifestada pela reacção do desvio de complemento e pela resistencia a uma nova inoculação do virus activo.

Recentemente, Bauer e Mahaffy publicaram os resultados das tentativas que fizeram para infectar, com o virus amarillico, certas especies de macacos africanos, quer pela injecção de sangue de um *rhesus* infectado, quer pela picada de *Aëdes aegypti* infectados. Suas experiencias foram feitas com quatro especies differentes: *Cercopithecus tantalus, Cercopithecus mona, Cercocebus torquatus* e *Erythrocebus patas*. Nenhum dos animaes succumbiu á infecção, mas, durante um certo numero de dias, o virus persistiu no sangue de todos, excepto no do *Cercopithecus mona* e poude ser transferido novamente ao *rhesus* pela injecção de sangue. Duas das especies, *Cercopithecus tantalus* e *Cercocebus torquatus*, foram capazes de transmittir a infecção a mosquitos normaes.

Embora não effectuassemos experiencias com mosquitos, os nossos resultados de infecções experimentaes approximam-se dos obtidos por Bauer e Mahaffy, apezar de realizadas as nossas experiencias com animaes domesticos (com o gato sobretudo) morphologicamente muito afastados dos macacos.

A este respeito e principalmente por terem sido feitas com animaes de habitos domesticos, podendo provavelmente ser picados por mosquitos de casa, as nossas

experiencias apresentam resultados de certa importancia no problema da epidemiologia da febre amarella, como facilmente se comprehende: os animaes domesticos, o gato sobretudo, poderiam, nesse caso, desempenhar algum papel na propagação do typho amarillico, quer conservando o virus activo e podendo transmittil-o, por intermedio dos mosquitos, a pessoas sensiveis, quer transmittindo-o já attenuado e contribuir, assim, para a immunização das pessoas.

Na primeira hypothese, os animaes domesticos concorreriam, embora indirectamente, para a propagação de epidemias, ao lado de outros factores já perfeitamente estabelecidos; na segunda, o virus attenuado, de que poderiam ser depositarios durante certo tempo, concorreria para a paulatina immunização dos naturaes dos paizes de endemicidade amarillica. Este mechanismo poderá ser tambem realizado por outros provaveis depositarios do virus, entre os quaes, e principalmente, o proprio homem nas suas infecções muitas vezes inapparentes.

A' luz das nossas experiencias, não podemos, por emquanto, concluir pela sensibilidade do gato ao virus amarillico adaptado ao *Macacus rhesus*, embora tenhamos base para consideral-o como um possivel depositario do virus durante certo tempo. E' bem verdade, porém, que as reacções e symptomas sobrevindos em alguns gatos por nós inoculados indicam que as experiencias e estudos com esses animaes merecem ser continuados.

E' possivel que o virus, pelas passagens successivas nos *rhesus*, tenha perdido sua virulencia em relação a estes felinos e mesmo para o proprio homem, pois isso acontece com o virus amarillico neurotropico que, depois de diversas passagens pelo camondongo branco, perde sua virulencia para o *Macacus rhesus*.

Nestas condições, julgamos que estes estudos devem ser repetidos em zonas onde ainda persista o mal, praticando-se, porém, a inoculação do sangue de doentes em gatos oriundos de zonas indemnes e, pois, não possivelmente immunizados.

E' interessante notar que estes factos talvez permittam explicar, sinão confirmar, certas observações feitas pelo povo do nordeste do Brasil, de os surtos epidemicos de febre amarella coincidirem ás vezes com uma curiosa mortalidade de gatos e ratos.

Ainda recentemente, tivemos opportunidade de receber, em nosso laboratorio, a visita do Dr. J. de Barros Barreto, secretario do Departamento Nacional de Saúde Publica, e mostrar-lhe os resultados das nossas experiencias acima relatadas. Interessando-se vivamente por ellas, contou-nos esse distincto collega que o Departamento tivera conhecimento de uma pequena epidemia occorrida no interior de Pernambuco e precedida de uma mortandade de gatos e ratos, que foi attribuida á peste. No entanto, a necropsia de dois casos fataes veiu mostrar que se tratava de febre amarella.

Assignalamos esta interessantissima observação para justificar, não somente o nosso modo de ver quanto á significação dos nossos resultados, mas ainda a necessidade de se estudar o assumpto em melhores condições experimentaes.

Capitulo III

Anatomia e histologia pathologica da febre amarella experimental

A pathologia da febre amarella experimental no *Macacus rhesus* foi estudada primeiramente por Paul Hudson, e, em seguida a elle, por numerosos autores, que sobre o assumpto apresentam valiosas contribuições.

Entre nós, este estudo vem merecendo especialmente a attenção dos pathologistas do Instituto Oswaldo Cruz, destacando-se os trabalhos e verificações de Margarinos Torres. Em S. Paulo têm tratado do assumpto o prof. Rocha Lima e os drs. J. Meyer e J. B. Arantes.

Pela histologia pathologica, que apresenta o maximo interesse na febre amarella, verifica-se, nos *rhesus* infectados com o virus, uma serie de alterações e lesões que correspondem ao chamado "signal de Rocha Lima", caracteristico da infecção amarillica humana.

Não entraremos em detalhes e commentarios sobre a pathologia da febre amarella experimental e suas modernas acquisições, assumpto fóra da nossa alçada e para o qual nos falta a necessaria competencia.

As verificações anatomo- e histo-pathologicas dos nossos macacos infectados foram feitas, no Butantan, por J. B. Arantes, nosso distincto companheiro de trabalho.

O nosso material foi enviado ao professor Rocha Lima, em cujo laboratorio tambem foi estudado pelo eminente mestre e pelo Dr. J. R. Meyer. Esse estudo do material que enviámos e referentes aos *rhesus* infectados com fezes de percevejos, confirmou, de maneira evidente, a infecção e os nossos resultados experimentaes já descriptos.

A respeito de histologia pathologica limitar-nos-emos, pois, a transcrever os resultados obtidos pelo dr. Juvenal Meyer, com o material de *rhesus* inoculado com fezes de percevejos infectados.

Macacus rhesus 38 - Foi inoculado com o virus africano e serviu para a infecção de 2 percevejos que nelle sugaram durante a reacção febril.

Resultado do exame histo-pathologico feito pelo dr. J. R. Meyer:

Exame n.º 261

Material: pedaços de figado, rim e baço de um *Macacus rhesus* registado no Instituto Butantan sob o n.º 38.

Laudo histo-pathologico

Figado: A estructura do orgão está bastante alterada. Grande numero de cellulas acha-se reduzido a restos granulosos corados em roseo pela eosina. Outros

elementos apresentam vacuolos e um protoplasma intensamente corado pela eosina, de fórma ameboide. Os nucleos estão alterados em muitas cellulas. No seu interior, ao lado do nucleolo, vêem-se, ás vezes, pequenas massas irregulares coradas em roseo. Espalhados irregularmente pelo parenchyma vêem-se pequenos grupos de leucocytos neutrophilos.

Baço: Nota-se na polpa vermelha que fica na peripheria do baço, intensa hyperemia dos seios venosos. Os seios sanguineos dessa porção desappareceram por completo devido á presença de um material corado homogeneamente em roseo. Na mesma porção e junto a esse material vêem-se as cellulas reticulares do orgão e um certo numero de pequenos focos de leucocytos neutrophilos. Bem visiveis, os corpusculos de Malpighi mostram, as mais das vezes, um centro formado por cellulas grandes e claras contendo de permeio abundante quantidade de restos de chromatina sob forma de granulos.

Rim: Glomerulos poupados. Tubulos tortuosos em sua maioria atapetados por cellulas tomadas de inchação turva. Tubulos collectores conteem raros cylindros corados homogeneamente em azul muito pallido.

Diagnostico:

Inclusões oxy-chromaticas do nucleo.
Infiltração leucocytaria do figado.
Infiltração leucocytaria do baço.

Macacus rhesus 43 - Inoculado com fezes emittidas e accumuladas do 2.° ao 12.° dias após a alimentação infectante de 2 percevejos no *rhesus* 38.

Resultado do exame histo-pathologico feito pelo dr. Juvenal R. Meyer:

EXAME N.° 273

Material: pedaços de coração, figado, rim e baço de *Macacus rhesus* registado sob o n.° 43 no Instituto Butantan.

LAUDO HISTO-PATHOLOGICO

Coração: Praticamente normal.

Figado: As cellulas hepaticas em sua grande maioria estão bastante alteradas, sendo que na maior parte se apresentam muito vacuolisadas.

Na parte peripherica dos lobulos pouco se distinguem os espaços portaes. As veias centraes são mais visiveis e apresentam a seu redor uma pequena porção de cellulas hepaticas que, alem da vacuolisação produzida pelo accumulo de gorduras, nada mais mostram digno de reparos.

Para fóra dessa porção, ao lado dos elementos vacuolisados vêem-se restos de cellulas, desprovidas de nucleo e com protoplasma fortemente corado em roseo homogeneo.

Entre esses elementos que ás vezes não mais se collocam com a disposição normal, em cordões, vêem-se numerosos polymorphonucleares.

Rim: Além de varios tubulos contorneados revestidos por cellulas tomadas de degeneração parenchymatosa, nada se encontra que mereça reparos.

Baço: Polpa vermelha mostra-se extremamente hyperemiada. Os corpusculos de Malpighi em sua maioria estão providos de centros germinativos e occasionalmente exhibem, na sua parte externa, pequenos fócos compostos de cellulas tendo em seu protoplasma numerosas granulações de chromatina apparentemente phagocytada.

Diagnostico:

I - Necroses extensas com desagregação de cellulas hepaticas e de leucocytos neutrophilos.

II - Alguns nucleos contendo substancia oxychromatica.

Macacus rhesus 49 - Inoculado com sangue do *rhesus* 43 e sangrado em periodo de reacção febril.

Exame histo-pathologico feito pelo dr. Juvenal R. Meyer:

Exame n.º 274

Material: pedaços de figado, baço e rim de um *Macacus rhesus*, registado no Instituto Butantan sob o n.º 49.

Laudo histo-pathologico

Figado: Acha-se muito alterada a estructura trabeculada dos acinos. As cellulas hepaticas ás mais das vezes estão dissociadas de modo a não mais formarem cordões continuos. Assim, dispostas isoladamente, estas cellulas mostram restos de protoplasma, corados fortemente em roseo, ora sob a fórma de elementos arredondados, ora sob forma de material granuloso. Nos logares em que as cellulas estão mais conservadas, vêem-se vacuolos no interior do protoplasma. Os nucleos em sua maioria estão tomados de chromatolyse pelo que se apresentam muito pallidamente corados. Em toda a extensão do parenchyma, depara-se franca infiltração por leucocytos neutrophilos.

Rim: Glomerulos praticamente normaes. Os tubulos contorneados apresentam um revestimento formado por cellulas tumefeitas e turvas. Muitas dessas cellulas apenas mostram uma ligeira sombra azulada na parte correspondente ao nucleo. Nos tubulos collectores vêem-se, com relativa frequencia, diversos cylindros de aspecto hyalino e algumas cellulas arredondadas.

Baço: Chama attenção a intensa hyperemia que se encontra em toda a polpa vermelha. Os seios estão totalmente occupados por uma substancia hyalina e rosea em cujo interior além dos restos das cellulas primitivas se vêem nu-

merosos leucocytos neutrophilos. Nos corpusculos de Malpighi encontram-se centros claros contendo, alguns, grande numero de granulações phagocytadas no interior das cellulas de aspecto endothelial. Nesses corpusculos ás vezes se depara pequena quantidade de um pigmento castanho amarellado.

Diagnostico:

Dissociação das cellulas hepaticas.

Necroses salpicadas do figado.

Infiltração leucocytaria diffusa do parenchyma hepatico por leucocytos neutrophilos.

Macacus rhesus 53 - Inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 43. Exame histo-pathologico feito pelo dr. Juvenal R. Meyer.

Exame n.° 279

Material: pedaços de figado, baço e rim de um *Macacus rhesus* registado sob n.° 53 no Instituto Butantan.

Laudo histo-pathologico

Figado: Apenas se mostram mais conservadas as cellulas hepaticas que ficam na visinhança immediata das veias centraes e dos espaços de Kiernan. As trabeculas que se extendem entre essas duas partes dos lobulos, mostram-se formadas por elementos com limites pouco nitidos, protoplasma vacuolizado ou carregado de granulos vermelhos. Muitos destes elementos não apresentam nucleos. Entre as cellulas assim alteradas encontram-se numerosos polynucleares. As cellulas da zona peripherica apresentam grande quantidade de gordura. Nos nucleos das cellulas hepaticas encontram-se raras inclusões oxychromaticas.

Baco: Os seios da polpa vermelha são bem visiveis devido á consideravel espessidão das paredes que os formam. Em seu interior vêem-se alguns elementos mononucleados e em suas paredes um numero muito grande de polynucleares. Os corpusculos de Malpighi são pequenos e raramente dotados de pequenos centros claros, contendo restos de chromatina.

Rim: Nos tubulos contorneados vêem-se cellulas grandes de protoplasma tumefeito e turvo. Os demais canaliculos ora apresentam um material granuloso, corado em roseo, dentro de sua cavidade, ora cylindros hyalinos.

Diagnostico:

1 - Necroses em grande quantidade na zona intermediana deixando apenas, em torno á veia central e espaços inter-lobulares, uma delgada camada de cellulas de aspecto normal e contendo gordura.
2 - Esteatose predominando na parte peripherica.
3 - Grande quantidade de leucocytos em desagregação na zona intermedia.

Estes resultados, como se vê, confirmam os nossos resultados experimentaes relativos á infectuosidade das fezes de percevejos que haviam picado um *rhesus* infectado, e são assignalados apenas por se referirem a assumpto que julgamos de importancia.

CAPITULO IV

Immunologia da febre amarella

Numerosos são os problemas, relacionados a phenomenos de immunidade, que poderão ser estudados na febre amarella e que nos proporcionam indicações e resultados do maior interesse ao serem encarados sob o ponto de vista estrictamente scientifico; pelo seu lado pratico tambem, no que diz respeito ao diagnostico, esses resultados e indicações nos fornecem armas valiosas para o combate do terrivel typho amarillico.

E' um facto muito conhecido que um ataque de febre amarella confere, geralmente, ao individuo uma immunidade permanente em relação á infecção.

Em seu trabalho fundamental sobre a febre amarella experimental, Stokes, Bauer e Hudson verificaram que pequenas porções de sôro de convalescentes, mesmo 0,1 cc., eram capazes de proteger os animaes contra doses mortaes de sangue virulento e contra a picada de mosquitos infectados.

Este facto serviu a Aragão para elucidar ou confirmar diagnosticos de casos duvidosos, bem como a Theiller e Sellards para mostrar a identidade dos virus americano e africano.

Desde que se descobriu um animal sensivel ao virus e no qual se reproduzia experimentalmente o seu modo de agir, procuraram os pesquisadores tirar deste facto o melhor partido possivel em beneficio da humanidade, preparando uma vaccina preventiva da molestia.

Verificado o facto de que o virus se multiplica no organismo do animal até sua morte e que é encontrado nos orgams, foram estes utilizados para esse fim.

I - Vaccina amarillica

1.° - Technica de Hindle.

De accordo com as directrizes seguidas para o preparo de vaccinas contra certas epizootias, Hindle preparou sua vaccina contra a febre amarella utilizando figado e baço de macacos infectados. Dois são os typos da vaccina de Hindle: uma fazendo a attenuação do virus com formol e outra com glycerina e phenol.

A vaccina formolada é preparada pela trituração do figado e baço de um animal que tenha morrido da infecção; emulsiona-se a pasta formada em 5 vezes o seu peso de agua physiologica addicionada a formol até se obter uma concentração a 1 °/₀₀, depois do que a emulsão é filtrada em gaze.

Para a vaccina glycerinada e phenolada, o figado e baço são cortados em pequenos pedaços e lavados em agua physiologica; depois de triturados é a pasta addicionada a 4 vezes o seu peso de uma mistura de: glycerina - 600 cc., phenol a 5 % - 100 cc. e agua distillada - 100 cc. A mistura é agitada, filtrada em panno, mantida uma semana na temperatura do laboratorio e depois na geladeira.

Para o preparo da vaccina, Hindle empregava figado que continha 10.000 doses mortaes por gramma. Mais tarde recommendou o emprego do dobro de formol usado a principio.

Com estas vaccinas, principalmente com a preparada pela segunda technica, o autor obteve resultados favoraveis quanto á protecção dos macacos em relação ao virus activo. Verificou que a immunidade conferida pela vaccina dura ao minimo 4 ½ meses. Hindle acredita que a protecção conferida pela vaccina seja tambem devida a uma immunidade tissular, pois verificou que o figado e baço de animaes restabelecidos da infecção, retirados e lavados em solução de Ringer para eliminar-se todo o sangue, tambem são capazes de vaccinar contra a infecção.

Verificou ainda que, em animaes hyperimmunizados com doses repetidas de emulsão de figado, a inoculação de uma grande dose de figado virulento foi seguida de morte rapida, em 48 horas, facto que elle attribue a um typo especial de anaphylaxia.

2.° - Technica de Aragão.

Antes de conhecer os trabalhos e resultados de Hindle, Aragão já havia iniciado o preparo de uma vaccina, utilizando tambem orgams de *rhesus* infectados e empregando uma technica semelhante á que usa para o preparo da vaccina contra a espirochetose das gallinhas (por meio de vapores de formol). Depois começou a preparar uma vaccina formolada a 2 °/₀₀ e phenolada a 5 °/₀₀, que lhe deu bons resultados experimentaes e que começou a ser empregada no homem.

A technica para o preparo desta vaccina é em suas linhas geraes a seguinte: quando o animal infectado entra na phase de hypothermia, é sacrificado. Os orgams são immediatamente retirados com a maxima asepsia, usando-se no preparo da vaccina o figado, rins, baço e cerebro que são collocados em placas grandes de Petri. Desde que são reconhecidos perfeitamente sadíos, são lavados em agua physiologica, enxutos em papel de filtro esteril e pesados. Em seguida são cortados em pequenos fragmentos que são collocados em um gral com areia lavada, esteril, sendo então cuidadosamente esmagados. Feito isto, addicionam-se para uma parte de orgam 5 de agua distillada esterilizada formolada a 2 °/₀₀ e phenolada a 5 °/₀₀, agitando-se e descollando-se o material até se obter uma emulsão fina e homogenea, que é filtrada em 4 folhas de gaze e recebida em um balão esteril. Permanece durante 5 dias na geladeira a 8°C., verificando-se sua esterilidade por semeadura e inoculação de 0,5 cc. em 2 cobaias. Estando esteril, é a vaccina distribuida em empolas de 2 cc. e semeada novamente. Si a esterilidade é perfeita e se as cobaias permanecem sadias decorrido o prazo de um mês, a vaccina é considerada prompta para o emprego no homem.

Julga Aragão que a dose melhor para a vaccinação do homem é de 4 cc. em uma só vez, ou em duas injecções com 10 dias de intervallo.

Mais tarde, para tornar mais activas as propriedades antigenicas da vaccina, Aragão passou a empregar, para uma parte de orgams 4 de vehiculo e para cada 2 litros de vaccina addicionava ainda 50 cc. de sangue desfibrinado e formolado colhido em *rhesus* doentes em differentes estados da infecção amarillica.

Os resultados experimentaes obtidos com a vaccina foram os mais satisfactorios. E' ainda cedo para se formar um juizo definitivo sobre seus resultados na prophylaxia amarillica, embora sejam elles animadores em algumas estatisticas já publicadas.

Preparamos diversas partidas da vaccina amarillica segundo a technica de Aragão e pudemos verificar os seus resultados favoraveis na protecção de macacos em relação a doses seguramente mortaes do virus. Tambem uma partida preparada segundo esta technica e que soffreu, além disso, maceração durante 7 dias na estufa a 37°, conservou suas propriedades antigenicas.

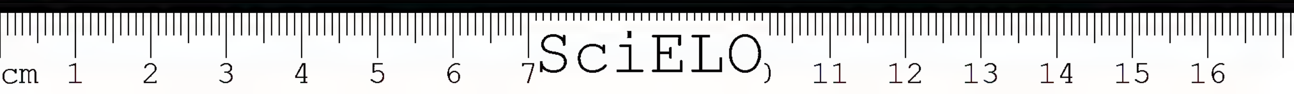
3.° - Vaccina chloroformada.

Em virtude das nossas observações quanto a resistencia do virus, mantido em condições optimas de temperatura, á acção dos antisepticos, procurámos verificar a acção que sobre elle exercia o chloroformio puro, naquellas mesmas condições, visto ter sido já utilizado por Kelser no preparo da sua vaccina contra a peste bovina (rinder-pest). Kelser e seus collaboradores verificaram que o virus da rinder-pest em tal vaccina morre promptamente, sem prejuizo do producto, podendo ser usada immediatamente após o preparo e conservando-se bastante activa pelo menos durante um anno. Como a vaccina preparada apenas com o sangue dos animaes, não tem valor immunizante (o que só se observa quando preparada com os orgams: ganglios lymphaticos, baço, figado), acredita Kelser que o principio activo da vaccina não seja somente o virus morto, mas tambem um sub-producto da reacção entre o tecido e o virus, ou o proprio virus da rinder-pest, modificado de alguma maneira especial pela actividade dos tecidos solidos. Esta supposição parece de accordo com o que Hindle chama *immunidade tissular*, em relação á febre amarella.

Rodier verificou que quando a vaccina de Kelser é preparada com tecidos altamente virulentos determina uma immunidade segura dos animaes sensiveis apenas com uma injecção de 20 cc. para os carabús em relação á infecção experimental e que, com a metade desta dose, pode ser protegido o gado susceptivel á infecção.

No preparo da nossa vaccina chloroformada contra a febre amarella, estabelecemos a technica simples que descrevemos a seguir:

a) Colher asepticamente os orgams (somente figado e baço) de um *Macacus rhesus* infectado com evolução caracteristica e sacrificado em periodo de hypothermia. Pesar e collocar os orgams em grandes placas de Petri esterilizadas;



b) Mergulhar em solução de phenol a 5 % durante 15 minutos;

c) Lavar, pelo menos duas vezes, em agua physiologica esteril;

d) Cortar em pequenos pedaços e triturar cuidadosamente em um gral com areia lavada e esterilizada;

e) Addicionar 5 partes de agua physiologica em relação ao peso e emulsionar bem;

f) Filtrar em um funil com 4 folhas de gaze e verificar o volume obtido;

g) Collocar a emulsão em um frasco com rolha esmerilhada, evitando que molhe o gargalo;

h) Addicionar chloroformio na proporção de 1 %;

i) Fechar o frasco e collocar num apparelho agitador que funccionará durante duas horas;

j) Retirar e deixar o frasco durante o resto do dia e a noite na frigidaire;

k) No dia seguinte, agitar o frasco, filtrar o liquido novamente em gaze num apparelho para distribuição;

l) Distribuir em empolas de 2 cc., agitando de vez em quando o apparelho;

m) Verificar a esterilidade do producto pela semeadura em meios aerobios e anaerobios e sua pathogenicidade pela inoculação de 0,5 cc. em cobaia;

n) Verificar seu poder immunizante na dose de 1 cc. para o *Macacus rhesus* em relação ao virus activo inoculado 15 a 20 dias mais tarde.

No estudo desta vaccina verificamos que o chloroformio puro tem acção destruidora sobre o virus amarillico, mesmo quando mantido em condições favoraveis de temperatura (2° C.), no fim de muito pouco tempo, sendo tambem evidente a acção immunizante da vaccina.

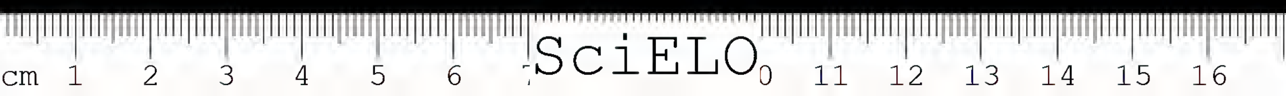
Resumamos algumas das nossas verificações:

Macacus rhesus 30. — Inoculado, em 30-IV-1929, com 1 cc. de vaccina chloroformada (partida 6) preparada com material do *rhesus* 26, depois de 3 dias do preparo. O animal não apresenta reacção alguma como consequencia da injecção. No fim de quasi 3 meses é inoculado com o virus africano activo (figado do *rhesus* 44), mostrando-se immunizado.

O *rhesus* 30 havia recebido antes desta injecção uma outra de sangue de um *rhesus*, que não se mostrou posteriormente infectado.

Macacus rhesus 50. - Inoculado em 18-VII-1929 com 1 cc. de vaccina chloroformada (partida 9) preparada na vespera (tendo pois 24 horas apenas) com material do *rhesus* 44. O macaco nada apresentou clinicamente de anormal, embora tenha tido, no fim de muitos dias, pequenas reacções febrís passageiras. Em 22-X-1929 foi inoculado com o virus activo (emulsão de figado do *rhesus* 80); nada apresentou de anormal, mostrando-se immunizado.

Vê-se pois, que a acção do chloroformio sobre o virus é rapida, mesmo em 24 horas, e que a vaccina preparada segundo a technica indicada apresenta evidente poder antigenico.



Em todo caso, não ha vantagem em se utilizar, no homem, producto muito recentemente preparado; isto não acontece porque somente depois das varias verificações a que são submettidas as differentes partidas da vaccina é que se poderão dar por concluidas; no fim de um mês pelo menos, é que a vaccina poderá ser entregue ao consumo.

Nesse prazo, mais efficaz se manifestará a acção do chloroformio e aconselhamos que, depois de distribuidas, as empolas sejam conservadas durante uma semana pelo menos na temperatura do laboratorio, num armario, e depois na geladeira.

Assignalamos esta technica que em nossas mãos deu bons resultados experimentaes, para que possa ser estudada por outros e para que sejam verificadas as suas possiveis vantagens praticas.

II - Sôro anti-amarillico

Pettit, Stefanopoulo e Frasey começaram a preparar o sôro anti-amarillico inoculando animaes com doses grandes de emulsão de figado de *rhesus* infectados com o virus amarillico. Fizeram as experiencias em 2 cavallos, duas especies de "baboons" (*papio* e *hamadryas*) e um *Cercopithecus*.

Em outro trabalho, os autores mostraram os resultados obtidos em 10 macacos, com o emprego do sôro dos animaes assim tratados: 5 inoculados com o sôro de "baboons" e 5 com sôro de cavallo. Em duas experiencias o sôro foi injectado um dia antes da dose do virus; nas outras o sôro foi dado no mesmo dia que o virus, no dia seguinte e 3 dias depois, sendo as injecções repetidas por 3 ou 4 dias. Nenhum dos animaes se infectou e todos resistiram a uma segunda inoculação de virus feita 14 dias depois da primeira. De dois *rhesus* inoculados com o virus, como testemunhas, um morreu e o outro se restabeleceu de um grave ataque da infecção.

Sinval Lins não verificou resultados curativos apreciaveis com o sôro de convalescentes, o mesmo acontecendo com o sôro de cavallo, immunizado pelo dr. H. Aragão com repetidas injecções de virus da febre amarella (sangue e figado de macacos infectados).

Fizemos tambem a immunização de um cavallo, inoculando-o repetidas vezes com doses crescentes de virus amarillico. Este cavallo recebeu 9 inoculações no espaço de 2 meses, sendo sangrado uma vez.

Nada poderemos dizer sobre o valor deste sôro, mesmo sob o ponto de vista experimental, para a verificação dos resultados de Pettit e seus collaboradores, por nos terem escasseado os animaes necessarios.

Em todo caso, deante dos resultados já obtidos no Rio, o sôro anti-amarillico até agora não desperta grandes esperanças para o tratamento da febre amarella.

III - Diagnostico da febre amarella

Se o diagnostico *post-mortem* da febre amarella não apresenta grandes difficuldades, graças principalmente ás publicações de Rocha Lima, o mesmo não acontece com o diagnostico *intra-vitam*, principalmente no inicio de epidemias e nos casos benignos ou frustros, que são em geral clinicamente de difficil reconhecimento, porque geralmente terminam pela cura e, assim, não permittem a confirmação histo-pathologica.

O estabelecimento de um diagnostico seguro, nas condições assignaladas, é de grande importancia para a prophylaxia efficaz do mal.

Na phase actual do estudo da febre amarella, este aspecto do problema tambem realisou os mais notaveis progressos quanto á sua solução.

Mostraremos, de um modo resumido, os methodos ultimamente estudados para o diagnostico immunologico da febre amarella humana e experimental.

1.° - Desvio do complemento.

Desde que iniciou seus estudos sobre a febre amarella, Aragão procurou estabelecer um methodo de desvio do complemento para o fim de diagnostico. Tomou como antigeno sôro de amarellento nos primeiros dias da infecção e extractos phenolados de figado de *rhesus* infectado. Nenhum resultado apreciavel obteve, o mesmo acontecendo com Arêa Leão, que usou extractos glycerinados.

Moses obteve resultados mais apreciaveis com o auxilio de coctoantigenos contendo virus e, lançando mão de uma technica que permitte avaliar o resultado da hemolyse e da precipitação, concluiu que é possivel, deste modo, verificar a presença de precipitinas e de anticorpos fixadores do complemento no sôro de doentes de febre amarella; que os anticorpos fixadores do complemento são encontrados desde o 3.° até o 24.° dias, formando-se com mais intensidade nos primeiros dias (5.° e 6.° dia) e diminuindo em seguida até desapparecer; que estes anticorpos são ausentes no sôro de individuos não infectados pela febre amarella e tambem não são postos em evidencia nos doentes, quando o coctoantigeno é preparado com orgam normal.

Joaquim Travassos, neste Instituto, não obteve resultados favoraveis com o emprego dos cocto-antigenos, preparados segundo a technica de Kraus e Takaki.

Frobisher, por meio de uma reacção de desvio de complemento, obteve resultados mais apreciaveis, usando como antigeno o figado de *rhesus* infectado, tratado a principio, por um soluto de NaCl a 9 %; este soluto, no fim de algum tempo, foi diluido com agua distillada para chegar á concentração physiologica. Segundo este autor, o methodo descripto offerece um meio para se identificarem, pelo menos em porcentagem util, os convalescentes de febre amarella.

Pesquisas pessoaes com J. Travassos

Hindle havia já verificado que o melhor meio de se obter o virus do figado era o de se provocar a cytolyse. Para isto o figado é triturado e addicionado com

soluto de NaCl a 9 %, ficando algumas horas na geladeira, depois do que se junta agua distillada para se ter uma concentração de NaCl a 9 ‰. A mudança brusca da pressão osmotica, rompendo as cellulas, liberta o virus em maior quantidade e a sua actividade não é diminuida.

Baseados nesse facto, preparamos eu e J. Travassos, um antigeno com o qual realizámos uma serie de ensaios, cujos resultados foram os mais animadores; esses ensaios constituem objecto de um trabalho que publicámos e, por isto, apenas serão aqui resumidos.

Antigeno: Logo que se inicia a queda da temperatura de um macaco infectado, elle é sacrificado; seu figado é pesado e cortado em pequenos pedaços, que são lavados varias vezes em agua physiologica. Os fragmentos são, então, collocados num gral e finamente triturados com areia esteril. Para cada gramma de orgam junta-se 1 cc. de um soluto hypertonico, esterilizado, de chloreto de sodio, de titulo conhecido (usamos a 10 %). Mistura-se bem, colloca-se num frasco com rolha esmerilhada e contendo perolas de vidro e deixa-se no frigo durante 24 horas. Junta-se, então, agua distillada esteril em quantidade sufficiente para que, addicionada á emulsão hypertonica, torne physiologico o soluto, isto é, com uma concentração final de NaCl correspondente a 8,5 ‰. A quantidade de agua necessaria é addicionada rapidamente á emulsão do figado preparada na vespera. Agita-se energicamente o frasco durante uma hora. Centrifuga-se ou filtra-se a emulsão em papel e depois em vela Mandler, de 14 libras de pressão. O filtrado obtido, de côr amarellada, é distribuido asepticamente em empolas; verifica-se sua esterilidade e conserva-se no "frigo". Esse filtrado constitue o antigeno para a reacção.

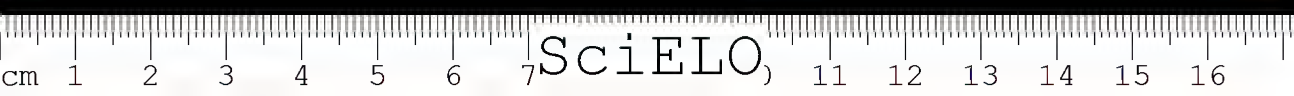
Estudando as propriedades do antigeno assim preparado, verificámos que, na dose de 0,2 cc. e em face de 2 unidades complementares, elle é desprovido de acção anti-complementar; tambem, nessa dose, é desprovido de acção hemolytica, isoladamente ou em presença de um sôro.

Verificámos que 0,05 era a dose minima de antigeno, necessaria para que, em presença de 0.2 de sôro e de 2 unidades complementares, produzisse completa fixação do complemento, sendo a leitura feita 10 minutos depois do apparecimento de hemolyse total no tubo testemunha do sôro.

Em face deste antigeno os sôros especificos só precipitam quando usados os dois elementos em partes iguaes, condição que deve ser observada ao se proceder a reacção.

Posteriormente verificámos que os antigenos preparados segundo a technica acima, porem apenas filtrados em papel e phenolados a 0,3 % são mais activos, podendo ser usados com vantagem.

Sôro a examinar: Verificámos em nossos ensaios, que alguns sôros, mesmo aquecidos a 55° em banho-maria, eram dotados de propriedades anti-complementares; outros produziam hemolyse, ora rapida (de 10 a 15 minutos), ora demorada, o que poderia correr por conta de hemolysinas naturaes que contivessem.



Entretanto, estas hemolysinas não exercem grande influencia na reacção, segundo a technica que adoptamos, pois que, em alguns sôros cujas testemunhas se hemolysavam rapidamente com uma ou duas unidades complementares, tivemos resultados francos de fixação de complemento, usando 3 ou 4 unidades complementares.

Complemento: São sangradas 3 cobaias machos, e o sôro, separado e conservado no frigo por 24 horas, é dosado principalmente em presença do antigeno e de um soro certamente negativo, de preferencia de um estrangeiro recemchegado ao paiz. A technica que adoptámos, permitte avaliar, em face do sôro, a maior ou menor contribuição deste no phenomeno da hemolyse.

Na dose de 0,2, o nosso antigeno accelera a acção da alexina, mas, em presença de um sôro, mesmo negativo, elle contribue para a formação de um complexo que fixa ligeiramente o complemento; dahi a necessidade de se empregar a technica que descreveremos adiante.

Systema hemolytico: A hemolysina empregada é a de coelho, anti-carneiro, usando-se 3 a 4 unidades hemolyticas.

Os globulos vermelhos são lavados e diluidos a 5 %.

Technica da reacção: No nosso trabalho com J. Travassos, sobre este assumpto, estudámos pormenorizadamente a technica e os motivos da sua adopção, razão por que não serão aqui reproduzidos.

Em rapidas palavras, a technica da reacção é a seguinte: a uma quantidade igual do sôro a ser examinado (0,2 cc.) e de antigeno (0,2 cc.) addicionam-se quantidades crescentes de complemento. Estas quantidades de complemento são avaliadas por unidades e a distribuição é feita de maneira a se ter uma serie crescente em unidades complementares.

A cada tubo da reacção deve corresponder um testemunha do sôro, ambos com identica quantidade de unidades complementares. O volume é completado para 1,5 cc. com agua physiologica e os tubos são incubados em banho-maria a 37°-38°, durante 1 ½ hora, na 1.ª phase da reacção, podendo esta incubação ser feita durante 4 a 5 horas na temperatura do laboratorio ou por uma noite na geladeira a 8°-10°C.

As hematias, sensibilizadas com 3 a 4 unidades hemolyticas, são addicionadas na 2.ª phase da reacção, em volume de 1 cc., seguindo-se nova incubação.

A leitura da reacção se fará cerca de 10 minutos depois que o tubo testemunha do sôro respectivo, correspondente em unidades complementares, apresente hemolyse completa, o mesmo acontecendo com um testemunha geral da serie, dosado tambem por unidades complementares, para o que se tomará um sôro certamente negativo, de preferencia de um estrangeiro recemchegado ao paiz.

Figurada a hypothese da unidade complementar ser 0,3 o eschema abaixo dará uma idéa da reacção:

	Sôro a dosar	Antigeno	Complemento a 1/20		Agua physiologica	1/2 hora em banho-maria a 37º - 38º	Globulos a 5% 3 a 4 unidades hemolyticas	LEITURA
			Unidades complementares	Quantidade				
Reacção	0.2	0,2	1	0,3	0.8		1 cc.	
T. de sôro	0.2	—		0,3	1,0		1 cc.	
Reacção	0,2	0,2	2	0.6	0,5		1 cc.	
T. de sôro	0,2	—		0.6	0.7		1 cc.	
Reacção	0.2	0.2	3	0,9	0,2		1 cc.	
T. de sôro	0.2	—		0.9	0,4		1 cc.	
Reacção	0.2	0.2	4	1,2	—		1 cc.	
T. de sôro	0,2	—		1.2	0,1		1 cc.	
etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.		etc.	

Leitura da reacção

A leitura da reacção é feita cerca de 10 minutos depois que o testemunha do sôro respectivo apresenta hemolyse completa. Com esta pratica conseguimos afastar os ligeiros impedimentos da hemolyse, que são observados, principalmente, nos tubos que contêm uma ou duas unidades complementares. A leitura realizada 24 horas após. sendo os tubos conservados no frigo, corresponde á feita na vespera, principalmente nos tubos de menores unidades complementares.

Para avaliação da intensidade da reacção tomamos como norma o resultado do 2.º tubo em diante, isto é. os resultados com 2, 3, 4 e 5 unidades complementares, no caso de o sôro não mostrar impedimento. Nos sôros impedientes, o resultado corresponde á differença de gráu de hemolyse; neste caso, só são tomadas em consideração as grandes differenças entre os tubos testemunha do sôro e da reacção propriamente dita e a leitura é feita após ½ hora de incubação, tempo em que é avaliada a unidade complementar.

Na segunda serie das nossas experiencias, somente empregámos esta technica para os sôros dotados de propriedades anti-complementares. Para os outros, a technica foi a geralmente usada na reacção de fixação, tomando-se doses decrescentes de sôros (0,2; 0,1 e 0,05 cc.), quantidade fixa de antigeno (0,2 cc.) e duas unidades complementares.

Resultados experimentaes

Praticamos a reacção com sôros de doentes e convalescentes de febre amarella, de *Macacus rhesus* infectados e immunizados, com sôros de doentes de outras infecções, de individuos normaes residentes ou não em zonas onde a febre

amarella tem existido e, finalmente, com sôros de estrangeiros recemchegados ao paiz.

Os quadros abaixo resumem os resultados experimentaes que obtivemos e que poderão melhor ser apreciados no trabalho sobre o "Diagnostico sorologico da febre amarella", tambem publicado em outra parte destas Memorias:

I. Na febre amarella humana:

Soros de	Negativos	Posit. fracos	Posit. fortes	
Suspeitos, diagnostico não confirmado	3	0	1	No de resultado positivo, a necroscopia revelou impaludismo.
Febre amarella diagnostico clinico	1	2	0	
Convalescentes	0	1	4	
Após 4 a 20 mezes da infecção	1	3	11	

II. Na febre amarella experimental:

MACACUS RHESUS	Total	Negativos	%	Positivos fracos	%	Positivos fortes	%
Normaes. . . .	3	3	100	0	0	0	0
Após 3 a 5 dias	12	7	58.3	5	41,6	0	0
Após 6 a 9 dias	8	3	37.5	4	50,0	1	12,5
Após 10 a 30 dias	26	0	0	3	11,5	23	88,4
Após 31 a 70 dias	5	0	0	0	0	5	100
Mais de 1 anno	11	2	18.1	5	45,4	4	36,3

Positivos fracos: reacção + e + +
Positivos fortes: reacção + + + e + + + +

III. Com soros de pessoas residentes em zona endemica do mal (Bahia).

Os resultados obtidos com o estudo de 67 soros de pessoas normaes, residentes em Salvador, são aqui resumidos:

Negativos	%	Positivos fracos	%	Positivos fortes	%
34	50,7	13	19,4	20	29,8

IV. Com sôros de estrangeiros recemchegados ao paiz.

Foram examinados 20 soros de Lithuanos e Japonezes que 24 horas antes haviam desembarcado em Santos. Em todos o resultado da reacção foi negativo.

V. Com soros de doentes de outras infecções:

Soros de doentes de	Negativos	Positivos fracos	Positivos fortes
Febre typhoide	18	0	2
Typho exanthematico . .	5	1	0
Doenças febris	13	1	2

Quasi todos estes sôros foram enviados ao Instituto Bacteriologico para elucidação de diagnostico e nos foram fornecidos com os resultados dos exames feitos.

Soros de pessoas normaes residentes em São Paulo, levados ao Instituto Bacteriologico para a pratica da reacção de Wassermann, foram tambem por nós estudados, sendo as seguintes as percentagens medias que obtivemos: negativos, 82,2 %; positivos fracos, 13,3 %; positivos fortes, 4,5 %.

Estes resultados são commentados no trabalho feito em collaboração com J. Travassos. A percentagem, embora pequena, de resultados positivos com soros de pessoas residentes em S. Paulo e de doentes de outras infecções, explicar-se-ia pela circumstancia de algumas destas pessoas terem, possivelmente, residido em zonas onde a febre amarella tenha existido endemicamente; apezar de não nos ter sido possivel apurar o facto, elle se justifica, em todo caso, pelos resultados obtidos com os soros de pessoas residentes na Bahia.

Verificámos que os soros de pessoas normaes residentes na Bahia e que possuem quantidade elevada de anticorpos fixadores de complemento (reacção ++++) são capazes de proteger o *rhesus* em relação á infecção experimental, como succede com o soro de convalescente. O quadro abaixo mostra o resultado desta verificação:

Soro de	Resultados da reacção	Animaes de prova	Testemunhas	Resultados da protecção
F. P. N., convalescente de febre amarella.	++++	Rhesus 107, inocul. c/ 2cc. de soro P. F. N., em 21-7-30; inocul. c/ virus (2cc. sangue do rhesus 105), em 22-7-30. Nada de anormal apresentou.	Rhesus 108, inocul. em 22-7-30 c/ virus (2cc. sangue do rhesus 105). Morte em 25-7-30 c/ lesões typicas.	Positivo
O. A. P. Guimarães, normal, residente na Bahia.	++++	Rhesus 120, inocul. em 12-8-30 c/ 2cc. de soro O. A. P. G.; em 13-8-30 inocul. c/ virus (2cc. de sangue rhesus 119). Nada de anormal apresentou.	Rhesus 122, inocul. em 13-8-30 c/ virus (2cc. sangue do rhesus 119). Evolução caracteristica, hypothermia, sacrificado em 21-8-30, apresentando lesões typicas.	Positivo
J. Magalhães, normal, residente na Bahia.	++++	Rhesus 121, inocul. em 12-8-30 c/ 2cc. de soro J. M.; em 13-8-30 inocul. c/ virus (2cc. sangue do rhesus 119). Nada de anormal apresentou.		Positivo

Como os resultados destas verificações e as considerações que despertaram constam de trabalho tambem encontrado neste volume, apenas transcrevemos, a seguir, as conclusões a que chegamos:

I. A infecção amarillica, tanto humana como experimental, depois de certo periodo da evolução, na convalescença e nos immunizados, pode ser diagnosticada por uma reacção baseada na fixação do complemento.

II. Para esta reacção o antigeno será preparado com figado de *rhesus* infectado, tratado por processo especial que liberte a maior quantidade possivel do virus. Este antigeno apresenta especificidade e sensibilidade na infecção, tanto humana, como experimental.

III. Os soros de nacionaes residentes em zonas onde o mal é endemico, em proporção de quasi 50 %, contêm anticorpos fixadores do complemento, o que não acontece com os soros de estrangeiros recemchegados ao paiz.

IV. Conforme se passa com os soros de convalescentes, os soros de nacionaes contendo anticorpos fixadores do complemento (reacção com ++++), são capazes de proteger o *Macacus rhesus* em relação á infecção experimental.

V. Tratando-se de soros de nacionaes oriundos de zonas de endemia amarillica, este facto poderá falsear os resultados da reacção quanto ao diagnostico post-infecção, mas isto tambem se dará da mesma forma com a simples prova de protecção do *rhesus* pelo soro de convalescentes.

2.° - **Diminuição da alexina.**

J. da Costa Cruz, procurou verificar se as propriedades alexicas do sôro não se encontravam alteradas na febre amarella; notou uma diminuição consideravel da alexina no sôro dos amarellentos, em relação aos individuos normaes, e a sua regeneração rapida nos convalescentes. Costa Cruz tira deste facto elementos para um methodo de diagnostico da febre amarella, o qual tambem pode servir como orientador do prognostico.

Verificando que o sôro dos individuos normaes produz hemolyse total na dose de 0,06-0,08 e mesmo em alguns casos de 0,04 em 30 a 40 minutos a 37°, Costa Cruz toma como prova da insufficiencia da alexina (limite da reacção positiva na febre amarella) a dose de 0,1 cc. de sôro.

O diagnostico da febre amarella pela dosagem da alexina forneceu a Costa Cruz 93,6 % de resultados concordes com o diagnostico clinico. Dentre os 6,4 % em desaccordo, em 5,7 % o diagnostico pela dosagem da alexina foi positivo, ao passo que o diagnostico clinico foi negativo; e em 0,97 % de casos o diagnostico clinico foi positivo e o da dosagem alexina negativo.

A dosagem da alexina serve tambem para o diagnostico na febre amarella experimental do *Macacus rhesus*.

A reacção de Costa Cruz, ensaiada com resultados favoraveis tambem em S. Paulo, por Luiz Salles Gomes, representa uma contribuição de valor, trazida ao problema da febre amarella na actual phase do seu estudo.

Além da febre amarella, raros são os estados morbidos em que se pode verificar esta diminuição da alexina. Costa Cruz poude verifical-a na atrophia aguda amarella do figado e em um doente de malaria dentre varios examinados. L. Salles Gomes a verificou em soros de doentes de typho exanthematico, em 3 casos estudados: no 1.º, com reacção de Weil-Felix positiva a 1/800, observou ausencia completa de alexina; no 2.º convalescente, com Weil-Felix positiva a 1/10.000, ausencia parcial e no 3.º, com Weil-Felix positiva a 1/200, o teor da alexina mostrava-se normal.

Mesmo assim, a reacção de Costa Cruz, constitue um elemento de grande valor para o diagnostico da febre amarella durante a evolução da infecção.

3.º - Modificações da coagulação sanguinea.

J. Vellard e M. Vianna verificaram que o poder coagulante do sôro não apresenta modificações particulares no decurso da febre amarella, e que, pelo contrario, a coagulabilidade do plasma é diminuida. Já accentuada no 2.º dia, esta diminuição progride até o 7.º e 8.º dias, para depois voltar rapidamente ao normal, durante a convalescença.

A estas interessantes modificações da coagulação sanguinea, os autores não encontram equivalentes em outros estados morbidos, acreditando poderem ser ellas utilizadas para o diagnostico precoce da febre amarella.

4.º - Diagnostico bacterio-immunologico. Reacção de agglutinação não especifica.

Baseados no facto, hoje admittido, da existencia do "biotropismo" de certos germes, no decurso de algumas affecções e infecções, principalmente devidas aos virus filtraveis, procurámos verificar se na febre amarella, tanto humana, como experimental, não se encontraria algum microorganismo que se comportasse, para com a infecção, como o Proteus X19 em relação ao typho exanthematico, segundo o testemunho da reacção de Weil-Felix. Esse microorganismo poderia ser, então, aproveitado com fins de diagnostico, se o seu comportamento assim o autorizasse.

Nossas pesquisas sobre este ponto foram iniciadas no laboratorio de Henrique Aragão, no Instituto Oswaldo Cruz e depois continuadas em S. Paulo. Sobre ellas apresentámos um trabalho pormenorizado á 4.ª Conferencia Sul Americana de Microbiologia, Hygiene e Pathologia, reunida em julho do anno passado no Rio de Janeiro.

As pesquisas foram feitas em relação a germes da flora microbiana intestinal e urinaria de casos clinicos e de infecção experimental em *Macacus rhesus*. Dos microorganismos assim isolados pudemos verificar que os do genero *Corynebacterium* apresentam maior interesse, não mostrando os representantes do grupo coli-typhico-dysenterico, entre os quaes o Proteus X19, nenhuma relação immunologica dotada de certa especificidade.

Um typo microbiano isolado de caso clinico occorrido no Hospital de Isolamento de São Paulo, onde poude ser acompanhado durante toda a evolução do

mal, foi estudado mais particularmente. Esse typo microbiano que recebeu o numero FH4 e que denominámos *Corynebacterium paraicteroides*, mostrou evidentes relações com a infecção, tanto humana, como experimental, sendo agglutinado no titulo de até 1 por 1280 e com elevada porcentagem, pelos sôros dos doentes depois do 3.° dia de temperatura, pelos de convalescentes e pelos de animaes infectados e immunizados em relação ao virus.

A technica da reacção, os detalhes dos resultados obtidos e as considerações que a respeito fizémos constam do trabalho referido.

Infelizmente, estas propriedades do typo microbiano estudado diminuem com a repetição das repicagens, sendo, por isto, muitas vezes difficil a interpretação dos resultados da reacção. Verificámos este facto em culturas datando de mais de 3 meses.

Além dos elementos já assignalados, de que hoje se dispõe, para firmar-se o diagnostico da febre amarella, de accordo com exames de laboratorio, é de grande vantagem tambem, na occasião de epidemias, o isolamento de typos microbianos semelhantes ao que descrevémos e que poderão igualmente, verificada a especificidade de suas propriedades agglutinantes em relação a sôros de convalescentes ou da infecção experimental, ser utilizados para o diagnostico bacterio-immunologico da febre amarella, segundo a reacção por nós assignalada.

Frobisher, mais recentemente, mostrou os resultados de reacções de agglutinação que praticou com soros de doentes e convalescentes, empregando germes isolados de fezes de macacos infectados, assim como typos do grupo coli-typhico-dysenterico, entre os quaes o *Proteus X19* e o *Proteus X2*. Verificou frequentemente a agglutinação, não havendo, porém, especificidade com qualquer destes typos. Aos mesmos resultados haviamos chegado com o estudo de typos microbianos semelhantes áquelles e com um *Proteus X19*. Todavia, esse autor não encaminhou suas pesquisas para outros grupos de micro-organismos (principalmente o *Corynebacterium*), passiveis tambem de ser isolados dos doentes e dos *rhesus* infectados, conforme succedeu com o typo microbiano cujas relações immunologicas estudámos.

Capitulo V

Associações microbianas e biotropismo de certos microorganismos no decurso da febre amarella humana e experimental

I - Considerações geraes

No decurso das doenças infectuosas, varios são os factores occasionaes o[illegible] mais ou menos constantes, que contribuem para a sua pathogenia, ao lado d[illegible] agente etiologico. Alguns delles são inherentes ao organismo infectado: sus[illegible]ceptibilidade, gráu de resistencia, etc; outros dependem das condições do mei[illegible]

e ainda outros são elementos super-ajuntados. Entre estes ultimos, merecem attenção especial as infecções secundarias ou sub-infecções, cujo estudo, muitas vezes, apresenta grande interesse scientifico.

Justamente essa questão de associações microbianas, em nossos dias, occupa lugar de destaque, principalmente por causa do interesse provocado pelos estudos sobre o metabolismo microbiano e das relações das bacterias entre si e com o meio onde vivem. Neste particular são bem conhecidos os phenomenos designados pelas expressões de *symbiose*, quando um germe favorece o desenvolvimento de outro ou quando ambos são beneficiados, se juntos; *metabiose*, quando a acção de um é seguida pela de outro microorganismo, e *antibiose* ou *antagonismo*, quando a acção de um é prejudicial ao outro. Como o mechanismo intimo destas relações não é ainda perfeitamente conhecido, W. L. Holman julga ser mais conveniente empregarem-se os termos "associação", para indicar o phenomeno de um modo geral, e "synergismo", introduzido por Kammerer, para a relação entre dois ou mais microorganismos, podendo o synergismo ser benefico ou antagonico.

E' já vastissima a literatura sobre o "synergismo" bacteriano, quer encarado sob o ponto de vista experimental, quer em referencia á flora microbiana do organismo animal.

No caso das doenças infectuosas, estas noções estão intimamente ligadas ao "biotropismo" de Milian, no qual podemos enquadrar as "infecções de sahida", de Nicolle.

Na verdade, podemos acceitar a existencia de um polymicrobismo latente no organismo animal e conceber as doenças infectuosas como resultantes de uma concorrencia biologica, da qual resulta quasi sempre o triumpho de uma especie, preexistente ou invasora, embora outras possam deixar accentuados vestigios de sua acção (Jausion, Pecker e Meersemann).

Varias são as causas, physicas, chimicas e biologicas que, promovendo no organismo um estado de anergia, são capazes de provocar a manifestação deste polymicrobismo latente, constituido por agentes visiveis e ultra-visiveis.

Entre as de natureza biologica, que mais nos interessam no momento, devemos collocar os *virus* chamados filtraveis.

São, na verdade, bem conhecidas e estudadas as infecções secundarias ou, generalizando mais, o "biotropismo" de certos germes, verificado em infecções causadas por *virus* filtraveis. Citemos alguns exemplos: sob a influencia do *virus* da influenza, desencadeia-se principalmente a acção de germes provocadores de pneumopathias (estreptococcos, pneumococcos, bacillo de Pfeiffer); tambem, como consequencias, póde manifestar-se o *virus* da encephalite epidemica.

O *virus* da variola e da vaccina facilita a acção de estaphylococcos e estreptococcos; bem como, no caso do ultimo, e em certas circunstancias, segundo alguns autores, a de outro *virus*, o da encephalite post-vaccinica, assumpto que

ultimamente vem preoccupando a attenção dos experimentadores, de varios paizes da Europa sobretudo.

A's vezes se observa a predominancia de determinado grupo de germes ou mesmo de determinada especie, como consequencia da influencia do *virus* invasor. Na peste porcina, sob a influencia de um *virus*, entram em campo cocco-bacillos, pasteurella, por muito tempo tidos como verdadeira causa da infecção.

No hog-cholera, facto semelhante occorre com predominancia de uma salmonella, como germe de sahida.

O mesmo facto pudemos verificar, juntamente com J. B. Arantes, em relação á *rinder-pest* (peste bovina), por occasião da epizootia em S. Paulo, em 1920.

Alguns autores, baseados em idéas modernas concernentes ás fórmas filtraveis das bacterias, chegam a admittir a hypothese, ainda um pouco ousada, de que os *virus* provocadores não sejam mais do que formas filtraveis e invisiveis dos microbios cujo biotropismo põem em evidencia sob uma forma visivel.

Grandes progressos precisam ser ainda realizados, com o estabelecimento de novos methodos experimentaes, para que se possa chegar á perfeita interpretação e explicação de factos experimentaes, apparentemente em desaccordo com noções classicas. Assim se poderá dizer dos trabalhos de Bronislava Fejgin sobre o typho exanthematico e das relações do virus com o *Proteus X19* e a *Rickettsia prowazeki*, os de Friedberger sobre a febre typhoide; os referentes á possivel relação do virus da verruga peruana e febre de Oroya com a bartonella de Noguchi, etc. A este respeito é justo mencionar um trabalho de Mayer (Martin) e Kikuth (Walter) do Instituto de Medicina Tropical de Hamburgo, referente á etiologia da verruga peruana e febre de Oroya; nesse trabalho elles approximam as bartonellas ás inclusões cellulares caracteristicas encontradas nos nodulos da verruga; essas inclusões estariam em connexão etiologica com o mal, representando uma forma do virus que determina a formação tumoral. Os autores citados não podem assegurar se estas inclusões serão o primeiro estagio da evolução das bartonellas livres ou se as proprias bartonellas terão penetrado nos angioblastos, multiplicando-se ahi.

Esta evolução dos nossos conhecimentos sobre a biologia microbiana impõe-se tambem em vista dos modernos estudos realizados por Hadley sobre a dissociação microbiana, dos trabalhos de Fontes sobre as differentes phases da evolução das bacterias, e, finalmente, dos recentes estudos sobre as formas filtraveis das bacterias.

Por todos esses motivos é que julgamos ser interessante verificar se, entre os microorganismos da flora microbiana intestinal e urinaria, existiria, na febre amarella humana e experimental, algum que de qualquer maneira pudesse mostrar relações com a infecção pelo facto de ter o seu biotropismo exaltado sob a influencia do virus invasor; seria preciso então que elle se comportasse como o *Proteus X19* em relação ao typho exanthematico, conforme o testemunho da reacção de Weil-Felix.

Ao lado do interesse scientifico destes estudos, cuja importancia o prof. J. C. G. Ledingham salientou em discussão na Royal Society, de Londres, este seu ultimo aspecto nos traria indicações de caracter pratico, merecedoras de verificação.

As pesquisas que realizámos sobre a flora microbiana intestinal e urinaria, por terem sido já publicadas com seus pormenores e resultados, não serão reproduzidas novamente. Transcreveremos apenas as conclusões desse trabalho, que foram as seguintes:

I - Em nossos dias, deve merecer maior cuidado, o estudo da flora microbiana de todo o organismo no decurso das doenças infectuosas e outros estados morbidos.

II - Na febre amarella podem ser isolados, nestas condições, microorganismos que apresentam certa relação immunologica com a infecção.

III - No decurso da febre amarella, tanto humana como experimental, os microorganismos do grupo dos *Corynebacterium* apresentam maior interesse pelo facto de serem mais evidentes e constantes as suas relações immunologicas com a infecção, em virtude do provavel "biotropismo" por elles manifestado sob a influencia do *virus* invasor.

IV - Um representante deste grupo, isolado de um caso clinicamente typico e com confirmação histo-pathologica, soffreu de um modo constante a influencia dos sôros de doentes seguramente attingidos do mal, de convalescentes e de *Macacus rhesus* experimentalmente infectados ou immunizados, não sendo influenciado pelos sôros normaes e, sómente em proporção minima e inconstantemente, pelos de doentes de outras infecções.

V - Entre os principaes caracteristicos desse germe destaca-se a modificação de suas propriedades biologicas de accordo com o meio em que é artificialmente mantido, assim como o poder lytico *in vitro* de suas culturas e filtrados em relação ás hematias humanas e do *Macacus rhesus* (acção hemolytica).

VI - A acção manifestada pelo *Corynebacterium* isolado e evidenciada pela reacção de agglutinação, poderá servir como elemento accessorio para o diagnostico da febre amarella humana e experimental.

VII - Esta propriedade agglutinante pode-se alterar com a idade e repicagens successivas em meios artificiaes, donde a conveniencia de a cultura ser relativamente recente.

VIII - Sómente o estudo de numerosos casos, com o isolamento de novos typos microbianos semelhantes, e outras pesquisas, determinarão com exactidão o papel porventura desempenhado por este microorganismo no desenrolar da infecção pelo *virus* amarillico, assim como a natureza da reacção com elle manifestada e a importancia que poderá ter o seu emprego com o fim de diagnostico.

No presente trabalho descreveremos, porém, as pesquisas que realizámos sobre a possivel existencia de microorganismos no sangue de *Macacus rhesus*

infectados com o virus, pesquisas a que fomos conduzidos depois de conhecer os trabalhos do professor Kuczynski sobre a etiologia da febre amarella.

Antes, porém, resumiremos os resultados desse autor, assim como os de Costa Cruz, sobre o assumpto.

II - Bacillus hepato-dystrophicans Kuczynski

Kuczynski e sua collaboradora Hohenadel publicaram, em principios do anno passado, os resultados das suas investigações referentes á etiologia e pathogenia da febre amarella, trabalho que logrou grande repercussão, taes as suas conclusões sobre o assumpto.

Assim é que conseguiram, empregando meios culturaes especiaes semelhantes ao que haviam usado para a cultura de Bartonellas e Rickettsias, o isolamento, tanto na febre amarella humana, como na experimental, de um microorganismo que denominaram *Bacillus hepato-dystrophicans* e que julgam ser o agente etiologico da infecção.

Conseguiram cultival-o, quer fosse do sangue, quer dos orgams dos animaes infectados e o descreveram como um pequenino germe, de forma variavel, geralmente coccoide, que se apresenta ás vezes como finos bacillos de formas irregulares. A cultura é a principio Gram negativa; mais tarde, principalmente nas culturas velhas, esta propriedade é variavel.

Affirmam os autores que uma amostra do germe, n.° 312, isolada da 11.ª passagem, após 19 dias de permanencia na estufa a 37°, e inoculada num *Macacus rhesus*, determinou a infecção e morte do animal em 13 dias, com as lesões caracteristicas. As passagens subsequentes da cultura em macaco não determinaram a infecção, porém a immunidade em relação ao sangue virulento.

Os autores, mais tarde, conseguiram isolar amostra mais virulenta com a qual prepararam uma vaccina que disseram ter protegido o macaco contra a infecção experimental. Assignalaram tambem que a cultura modifica suas propriedades nos meios artificiaes.

Considerando o *Bacillus hepato-dystrophicans* como o agente etiologico da febre amarella, alem da sua forma de virus, Kuczynski mostra o seu modo de pensar referente á pathogenia do mal.

Kuczynski foi convidado a vir ao Brasil para fazer a demonstração dos seus resultados e estudar o mal em nosso meio. Chegado ao Rio de Janeiro, em companhia de sua collaboradora, durante muito tempo guardou suas culturas, não as fornecendo para estudo e confirmação, mesmo aos technicos do Instituto Oswaldo Cruz, onde havia organizado o seu laboratorio.

Na capital Federal, perante a Academia de Medicina e na 4.ª Conferencia Sul-Americana de Microbiologia, Hygiene e Pathologia, fez a exposição dos seus resultados e das suas theorias a respeito do palpitante assumpto.

Nessa occasião solicitamos a Kuczynski as suas culturas para nossos estudos em S. Paulo, porém não fomos, neste intento, mais felizes que os collegas de

Manguinhos. Só mais tarde, de accordo com os desejos do director do Instituto Oswaldo Cruz, o prof. Kuczynski accedeu em fornecer culturas do seu germe a Costa Cruz, illustre assistente daquelle Instituto.

III - Verificações de Costa Cruz sobre o bacillo de Kuczynski

Costa Cruz communicou á Sociedade Brasileira de Biologia, os primeiros resultados dos seus estudos bacteriologicos sobre as culturas que lhe foram fornecidas.

Pelo seu interesse, resumiremos os resultados a que chegou Costa Cruz e que foram os seguintes:

Morphologia do germe: - Amostra 645 do *Bacillus hepato-dystrophicans*. Apresenta-se em geral como pequenos bastonetes de 1 a 3 micra de comprimento, por 0,3 a 0,7 de micron de largura. Immoveis, não produzem esporos, coram-se facilmente pelas cores básicas da anilina, retêm bem o Gram; em meios menos favoraveis são Gram-duvidosos. Nos esfregaços, encontram-se isolados ou em pequenas agglomerações, ás vezes em pequenas cadeias de 3 elementos, podendo ser confundidos com formas bacillares longas. Formas ramificadas em V e Y não são raras.

Culturas: Não se desenvolvem em aerobiose nos meios habituaes (caldo simples, caldo sôro, gelose ascite sangue, sôro coagulado, sôro de leite, meio de Noguchi com e sem hemoglobina). Nos meios de Kuczynski, com orgam, desenvolvem-se bem em 2 ou 3 dias: filamentos numerosos nascem do orgam, lembrando cogumelos. Nesses meios, mas privados de orgam, só se observa desenvolvimento se a semeadura é muito abundante; a parte turva de 2 ou 3 cm. da semente augmenta e ganha profundidade. Em anaerobiose, a amostra desenvolve-se em todos os meios.

O meio de escolha é o caldo glycosado acido, em anaerobiose, com pH proximo a 6,4. Ha turvação entre 24 e 48 horas e grande deposito no fundo. A temperatura optima é 37°, no meio de escolha; tambem se desenvolve a 26° (temperatura do laboratorio), porém mais lentamente. A 20° não se desenvolve. Em gelose glycosada a 1 % (pH=6,4), em camada alta, o desenvolvimento se faz até 1 cm. da superficie, turvando o meio. Na superficie, não ha proliferação. Em meios para fermentação de assucares (agua peptonada Martin- pH=6,4, assucares a 1 %), observa-se fermentação intensa da glycose, glycerina e galactose (com producção de acido e gazes). Em presença da maltose, mannita, arabinose, raffinose, inulina, dextrina, lactose ou saccharose, o desenvolvimento é lento, sendo difficil dizer-se se houve, mesmo no fim de 20 dias, leve acidificação dos meios. Não coagula o leite e não liquefaz a gelatina.

Resistencia ao calor: Não resiste a 55° durante meia hora. Em 20 minutos ainda ha germes vivos, podendo proliferar com repicagens abundantes (1,5 cc.).

Filtrabilidade: Em velas Chamberland F, pressão de 40 cm., os germes ficam retidos e estereis as semeaduras.

Poder pathogenico: O germe não se mostrou pathogeno para o camondongo, cobaia, coelho e *Macacus rhesus*.

Propriedades antigenicas: Em agua physiologica é agglutinado com sôros humanos, tanto normaes, como de convalescentes de febre amarella, ao titulo de 1/20 ou 1/40. Com sôro de 2 *rhesus* hyperimmunizados não houve agglutinação mesmo a 1/20.

Dois *rhesus* inoculados, um com 5 cc. de cultura de 5 dias em caldo simples e outro com 10 cc. de cultura abundante em caldo acido, contendo hemoglobina de coelho, não apresentaram alterações de saúde.

Decorridos 20 dias, o 1.° foi inoculado com 2 cc. de sangue do *rhesus* 14, colhido no 1.° dia da febre (virus amarillico) e o 2.° com 1 cc. do mesmo sangue. Ambos succumbiram de infecção amarillica, typica do ponto de vista clinico e histo-pathologico.

Conclusão: As propriedades encontradas no *Bacillus hepato-dystrophicans* Kuczynski, amostra 645, não autorizam concluir que haja uma relação etiologica entre esta bacteria e a febre amarella. Trata-se de um bacillo diphteroide, parente muito proximo do *Corynebacterium lymphophilum* Torrey, 1916 (J. of Med. Res. 1916, vol. 34 p.655), da qual não se distingue pela fermentação dos assucares.

IV - Pesquisas de microorganismos no sangue de *Macacus rhesus* infectados com o virus amarillico

Depois que tivemos conhecimento pessoal dos trabalhos do prof. Kuczynski, por ouvir sua exposição feita por occasião dos congressos commemorativos do Centenario da Academia Nacional de Medicina em julho do anno passado, resolvémos iniciar a pesquisa de microorganismos no sangue dos nossos macacos experimentalmente infectados com o virus.

Os nossos primeiros resultados foram resumidos numa ligeira nota que annexamos ao nosso trabalho publicado nos "Archivos de Hygiene". Mostrámos nella ter isolado do sangue de um *rhesus* infectado um germe que muito se assemelhava ao descripto por Kuczynski e que classificámos como um *Corynebacterium*.

Escrevémos então:

"Continuando nossas pesquisas relativas á presença de microorganismos na corrente circulatoria de *rhesus* experimental infectado pelo "virus" amarillico, fizemos ultimamente algumas observações que julgamos de interesse assignalar. Como meios culturaes, alem dos commummente usados, empregamos agora um meio preparado segundo a formula indicada pelo prof. Kuczynski. De algumas experiencias realizadas tivemos até agora somente um resultado positivo.

Sangue do coração do *rhesus* 44, colhido durante um periodo de reacção febril, é semeado nos differentes meios. No fim de 4 dias, somente nos tubos com o novo meio cultural, se observa ao microscopio a presença de microorganismos. Nas preparações coradas pelo methodo de Gram e Giemsa, verificam-se pequenos bacillos ou melhor coccobacillos e elementos coccoides, Gram positivos, reunidos geralmente em grupos. Nas primeiras repicagens para o mesmo meio, assim como para gelose-sôro e gelose sangue, o germe mantem mais ou menos o mesmo aspecto morphologico. Já na 3.ª sub-cultura, tanto em meio original, como nos outros assignalados e tambem no caldo glycosado, se verificam, alem dos elementos coccoides, bastonetes Gram positivo, com a disposição e outros caracteristicos morphologicos do grupo *Corynebacterium*.

A adaptação do germe aos meios que não sejam o original se faz com difficuldade. Ella está sendo continuada e tambem estudadas as differentes propriedades do microorganismo.

Um estudo minucioso a respeito deste germe, assim como das outras pesquisas realizadas com o mesmo fim em outros *rhesus* infectados, será objecto de trabalho posterior.

Em todo caso, o facto do isolamento de germes com o aspecto de "*Corynebacterium*", do sangue de *rhesus* infectado vem corroborar a nossa conclusão de que "estes microorganismos têm provavelmente o seu "biotropismo" exaltado sob a influencia do virus amarillico e que somente a continuação dos estudos nos indicará a sua verdadeira influencia no processo morbido amarillico".

Por esta descripção summaria, verifica-se que o germe que isolámos do *rhesus* 44, embora fosse um *Corynebacterium*, segundo confirmação de pesquisas posteriores, apresenta algumas differenças biologicas com o isolado por Kuczynski e estudado por Costa Cruz. A principal differença é que o germe de Kuczynski não se cultiva, absolutamente, em meios aerobios. O mesmo parecia acontecer com o germe que estudámos; porém, como assignalámos, com difficuldade conseguimos sua adaptação aos meios que não fossem o original. Assim é que, em gelose-sangue a nossa amostra se cultiva em aerobiose, com relativa facilidade, o mesmo acontecendo com o meio gelose-sangue-glycosado e gelose-sangue-chocolate.

Dado o interesse despertado pela verificação de *Corynebacterium* na febre amarella, em seguida áquella nossa descripção de um typo isolado da flora intestinal de um amarellento e possuidor de certa relação immunologica com a infecção humana e experimental, e em resultado das observações feitas sobre o germe de Kuczynski pelo nosso estimado collega Costa Cruz, parece-nos necessario darmos os resultados das pesquisas que realizámos de microorganismos no sangue de *rhesus* experimentalmente infectados com o virus, assim como em outros animaes inoculados.

Technica empregada.

As semeaduras foram feitas com sangue de 4 *Macacus rhesus* experimentalmente infectados com o virus amarillico. Foram usados os *rhesus* nos. 43, 44, 53 e 62, cuja historia clinica já foi feita em outra parte deste trabalho.

O sangue colhido por puncção cardiaca, com todos os cuidados de asepsia, foi immediatamente distribuido em tubos contendo os varios meios culturaes.

Além dos meios commummente usados em bacteriologia (meios communs, com sôro, ascite e glycosados) empregámos meios especiaes preparados segundo a formula indicada pelo prof. Kuczynski na sua communicação á 4.ª Conferencia Sul-Americana (meios com e sem orgam). As culturas foram mantidas na estufa a 37° e examinadas constantemente para a verificação da presença de microorganismos por ventura desenvolvidos.

Resultados.

Com o sangue de dois *rhesus* (53 e 62) observou-se o desenvolvimento de germes que não apresentavam os caracteristicos do descripto por Kuczynski. Num observou-se o desenvolvimento, mesmo em meio não especial, de uma bacteria Gram positiva e noutro (alem de outros elementos), de um germe Gram negativo, este com os caracteristicos de uma Pasteurella. Estes dois *rhesus* estavam em hypothermia e, provavelmente, já teria havido invasão microbiana do sangue. O mesmo se verificou com orgams (figado) colhidos na necropsia e tambem semeados nos meios.

Com sangue, colhido em periodo de reacção febril, do *rhesus* 43 não se observou desenvolvimento microbiano.

Com o do *rhesus* 44, colhido em periodo de reacção febril, observou-se no fim de alguns dias e nos meios especiaes somente, a proliferação de um microorganismo que, pelos seus caracteres morphologicos e culturaes, se approximava do descripto por Kuczynski, merecendo, por isto, um estudo mais accurado.

Faremos a seguir a descripção das principaes caracteristicas morphologicas e biologicas deste germe, que denominámos R44s, e sua classificação.

Posteriormente, a pesquisa de micro-organismos foi praticada com sangue, colhido em reacção febril, de 3 outros *rhesus* infectados com o virus, sendo negativos os resultados das culturas.

1.° - Corynebacterium R44s. Isolamento.

Em 15-VII-1929 foi sangrado, por puncção cardiaca, o *rhesus* 44, na occasião em que a temperatura estava a 40°, sendo o sangue immediatamente semeado nos differentes meios. Em 17-VII-1929 foi o animal sacrificado, por se achar na phase hypothermica; por occasião da necropsia semeou-se ainda o sangue do coração e figado. No dia seguinte, como resultado desta segunda semeadura,

observou-se em todos os tubos o desenvolvimento microbiano de um bacillo Gram negativo, provavelmente germe de invasão.

O resultado da cultura da primeira semeadura, em 15-VII-1929, quando o animal estava em reacção thermica, despertou maior interesse.

Em 20-VII-1929, examinadas as culturas, verificou-se nos meios de Kuczynski, em esfregaços corados pelo methodo de Gram, a presença exclusiva de microorganismos muito pequenos, coccoides ou cocco-bacillos Gram positivos, reunidos geralmente em grupos, vendo-se alguns elementos isolados.

Nas sub-culturas verificou-se que o germe não se desenvolvia facilmente nos meios communs em aerobiose. O seu desenvolvimento se dava no meio de Kuczynski, com o mesmo aspecto de elementos coccoides. Observou-se tambem que se desenvolvia nos meios com sôro, gelose sôro em aerobiose, mas com difficuldade, formando inducto quasi que invisivel; ainda assim desenvolvia-se um pouco melhor em meio com sangue, isto é, na gelose-sangue. Em meios liquidos (caldo sôro), observou-se no fim de alguns dias uma turvação ligeira e deposito; em caldo glycosado tambem se notou ligeira turvação e deposito viscoso no fim de alguns dias. Em qualquer destes meios e em aerobiose foi difficil a conservação do germe. Esta difficuldade foi, porém, menor em gelose-sangue onde era a bacteria mais facilmente mantida quando resemeada semanalmente, ou cada 15 dias, o mesmo acontecendo com gelose-sangue-glycosada e gelose-sangue-chocolate.

2.° - Descripção do Corynebacterium R11s.

O germe em questão apresenta um grande pleomorphismo, de modo que seu aspecto morphologico differe segundo o meio em que vegeta.

Em meios com ascite (de Kuczynski e gelose ascite) apresenta-se como pequenos elementos coccoides, não se observando, sinão muito raramente, elementos bacillares. Estes pequeninos elementos coccoides são geralmente reunidos em massas onde se apresentam como numerosos pontos. São Gram positivos, não resistindo porém a uma descoloração muito intensa. Lembram tambem o aspecto das *Rickettsias*, quando coradas pelo azul de Loeffler.

Em gelose-sangue, porém, o seu aspecto já é outro: apresenta-se como bacillos, geralmente pequenos, Gram positivos, com pontos mais escuros. Notam-se elementos finos em uma das extremidades e largos na outra, piriformes, ou em forma de halteres e tomando disposição varia, em "palissade", em V, etc.

Colorindo-se pelo methodo de Neisser, verificam-se granulações metachromaticas numerosas, com tamanho e disposição que acompanham o corpo bacillar. Mesmo pelo Giemsa e azul de Loeffler estas granulações se evidenciam, corando-se mais intensamente.

Tem-se a impressão de que, nos meios com ascite, só se córam estas granulações; dahi a forma coccoide dos elementos, e em razão de se confundirem os corpos bacillares na massa dos elementos.

Acção sobre os assucares.

Em meio agua-sôro, usando como indicador o vermelho phenol, verificámos a acção do germe em relação a alguns assucares. Os resultados constam do quadro abaixo:

ASSUCAR	RESULTADO NO FIM DE DIFFERENTES DIAS NA ESTUFA A 37°							
	24 horas	48 horas	3 dias	4 dias	5 dias	7 dias	12 dias	15 dias
1 Maltose . .	—	—	—	—	—	—	—	—
2 Glycose . .	—	±	+	+	+C	+C	+C	+C
3 Levulose .	+	+	+	+	+	+	+	+
4 Saccharose	—	—	—	—	—	—	+	+
5 Lactose . .	—	—	—	—	—	—	—	—

Legenda: — não acidifica; + acidifica; ± acidifica ligeiramente; +C acidifica e coagula o sôro.

Verifica-se pelo quadro acima que o R44s não fermenta a maltose nem a lactose mesmo no fim de 15 dias a 37°; a glycose começa a ser fermentada ao cabo de 48 horas e, depois de 5 dias, observa-se, além da fermentação, a coagulação do sôro; a levulose é fermentada em 24 horas e a saccharose somente no fim de 12 dias. Não fizemos ainda a verificação em relação a outros hydrocarbonados.

Classificação.

Com os elementos já mencionados classificamos o nosso *R44s* como um *Corynebacterium.* Quanto á especie, encontramos difficuldade em filial-o a alguma já descripta e do nosso conhecimento. Pelo seu aspecto morphologico e cultural em certos meios verifica-se que se pode approximar ao microorganismo semelhante a *Rickettsia* (*Rickettsia*-like organism) descripto por A. W. Sellards como agente etiologico da "tsutsu-gamushi", ou febre das enchentes do Japão, transmittida por certas especies de percevejos, conhecidos naquelle paiz pelo nome vulgar de "akamushi", infecção que se assemelha com o typho exanthematico e com a febre das montanhas rochosas, as quaes se differenciam principalmente pelo comportamento experimental do virus em relação ás cobaias.

Como differenças mais notaveis entre o nosso e o microorganismo descripto por Sellards, verifica-se ser o ultimo Gram negativo (no nosso, isto acontece se se prolongar a descoloração pelo alcool) e ter apenas 2 granulações collocadas geralmente uma em cada polo. Em relação aos assucares, o comportamento do que isolamos está descripto no quadro acima; o descripto por Sellards fermenta a glycose, maltose e dextrina com formação de acido (sem gaz) e não modifica a lactose e saccharose.

Somente um estudo mais detalhado do germe que isolámos poderá permittir sua verdadeira collocação systematica. Apresenta elementos essenciaes para sua classificação entre os *Corynebacterium*; por outro lado, não são poucas as suas caracteristicas (em certos meios culturaes) que o approximam das *Rickettsia*, de accordo com descripções de diversos autores.

Nestas condições, para o momento, designaremos o nosso microorganismo por *Corynebacterium R44s*, que indica sua origem (sangue do *rhesus* 44).

Pathogenicidade.

A pathogenicidade do *Corynebacterium R44s* foi verificada em relação á cobaia, ao coelho e ao *Macacus rhesus*.

Cobaia 475 inoculada com 2 cc. de cultura em caldo glycosado (proveniente da 3.ª sub-cultura em gelose-sangue) de 3 dias; inoculação sub-cutanea em 30-VII-1929. Esta cobaia não apresentou reacção febril, porém morreu na manhã de 16-VIII-1929. Na necropsia observaram-se phenomenos congestivos nos orgams, figado principalmente.

Os orgams, examinados pelo dr. J. R. Meyer, "não apresentavam alterações histo-pathologicas dignas de reparo".

Cobaia 342 - Inoculada em 30-VII-1929 com a mesma cultura que a anterior, porém por via peritoneal, não mostrou alteração thermica até 3-VIII-1929; nessa occasião apresentou paresia e temperatura de 35°,2, sendo sacrificada e necropsiada nesse dia.

Pela necropsia notou-se: figado congestionado, baço de aspecto normal; supra-renaes de coloração amarella, não congestas, talvez ligeiramente augmentadas. Vesicula biliar cheia. Bexiga cheia; a urina não continha albumina. Sangue do coração e exudato peritoneal, semeados em meios communs, não deram cultura. Pelo exame directo no exudato peritoneal não se observaram germes.

Estudados tambem pelo dr. J. R. Meyer, os orgams desta cobaia, "em numerosos cortes examinados, não apresentavam lesões importantes; apenas no pulmão se vê generalizado processo congestivo e nos rins, bem como no figado, degeneração parenchymatosa dos epithelios".

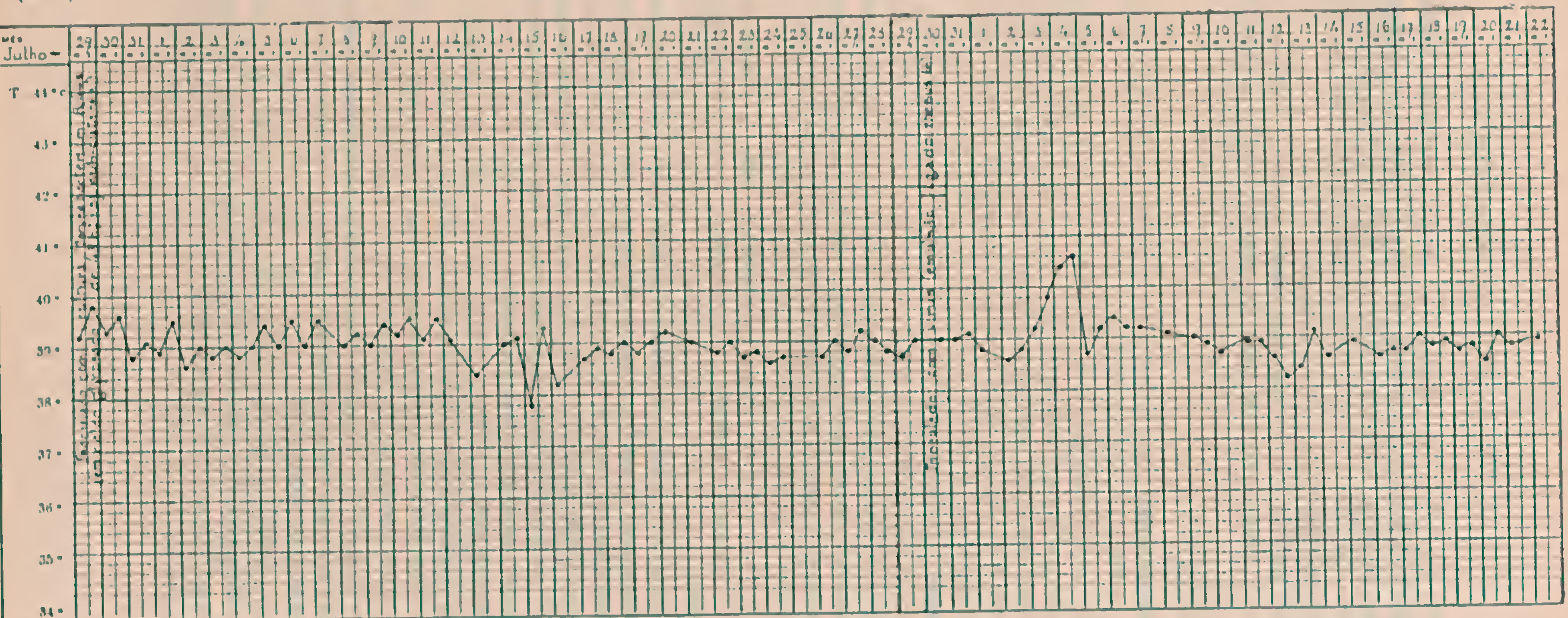
O sangue do coração destas 2 cobaias, retirado durante a necropsia, foi semeado em differentes meios communs, não se obtendo culturas.

Coelho 446 - Inoculado como as cobaias, porém na veia (2 cc.) tambem em 30-VII-1929, nada apresentou de anormal durante longa observação.

Macacus rhesus 59 - Inoculado com a cultura do R44s em caldo glycosado (proveniente da 3.ª sub-cultura em gelose sangue) de 48 horas. Inoculação sub-cutanea de 5 cc. em 29-VII-1929.

Como se vê do graphico 44, o *rhesus* não apresentou reacção febril durante um mês de observação; passado esse tempo, em 30-VIII-1929 foi inoculado com virus amarillico (emulsão de figado do *rhesus* 66), seguramente activo e com testemunha positivo (*rhesus* 69).

Macacus rhesus N.º 59
(1930)



Graphico 44

Depois de 4 dias de incubação o macaco apresentou uma infecção amarillica; a temperatura attingiu 40°,6 em 4-X-1929; cahiu a 38°,7 no dia seguinte e depois se manteve em media normal, resistindo o macaco á infecção.

Macacus rhesus 71 - Inoculado em 12-IX-1929 com emulsão de um tubo de cultura do *Corynebacterium R44s* em gelose ascite (2.ª sub-cultura neste meio, tendo vindo da gelose-sangue). Emulsão em 5 cc. de agua physiologica e inoculação intra-peritoneal.

O *rhesus* não apresentou reacção febril nem qualquer symptoma anormal. Em 22-X-1929 foi inoculado com o virus (emulsão de figado do *rhesus* 80). Como consequencia desta inoculação, verificou-se depois de varios dias pequena elevação thermica até 40° e volta ao normal, resistindo o macaco á infecção.

Macacus rhesus 72 - Inoculado em 12-IX-1929 com emulsão de um tubo de cultura de 24 horas do *Corynebacterium R44s* em gelose-sangue, onde vem soffrendo repetidas repicagens. Emulsão em 5 cc. de agua physiologica e inoculação peritoneal. No 2.° dia a temperatura attingiu 40°,2 e voltou ao normal, onde permaneceu por varios dias, no fim dos quaes tornou a attingir 40°. Verificaram-se voltas da temperatura ao normal e varias ascensões além de 40°, permanecendo porém o animal sem outros signaes quaesquer de infecção.

Em 22-X-1929 foi inoculado com o virus amarillico (emulsão de figado do *rhesus* 80), tendo tido apenas reacção febril acima de 40°. No 4.° dia da inoculação a temperatura voltou á media normal e ahi permaneceu.

Como se vê por estes resultados, o *R44s* apresenta certa pathogenicidade para os animaes de laboratorio. Duas cobaias, inoculadas com cultura ainda recente, succumbiram á injecção. Para o coelho o germe não se mostrou pathogeno. Em relação ao *Macacus rhesus* o mesmo se poderia dizer; apenas a cultura em gelose-sangue, meio aerobio que se mostrou mais favoravel ao seu desenvolvimento, determinou reacção febril do animal, reacção que nada de caracteristico apresentou em relação á infecção amarillica.

Propriedades antigenicas e relações com a febre amarella.

De grande importancia seria o verificar se o *Corynebacterium* isolado apresentava, nas culturas em meios artificiaes, qualquer relação com a febre amarella experimental; isto se poderia observar pela sua acção antigenica em relação ao virus, manifestada pela protecção dos *rhesus* inoculados anteriormente com elles, ou pela agglutinação soffrida sob a acção de sôros de convalescentes ou de macacos immunizados.

Quanto ao primeiro aspecto da questão, verificámos, como se vê acima, que um *rhesus*, o n.° 59, inoculado com a cultura em caldo glycosado, não se mostrou immunizado em relação ao virus, tendo tido infecção amarillica, caracterizada pela curva thermica, embora não mortal.

Outros dois *rhesus* tambem foram inoculados com cultura; o de n.° 71, com cultura em gelose-ascite e o de n.° 72, com cultura em gelose-sangue; ambos re-

sistiram a uma segunda inoculação do virus, podendo-se dizer que apenas tiveram uma infecção ligeira. Não acreditamos numa relação verdadeiramente especifica do germe em relação á infecção experimental, pois, além de o ultimo virus inoculado poder estar attenuado, não se usou testemunha por falta de macacos normaes na occasião (o que inoculámos com esse fim foi dos primeiros já usados e se mostrou refractario).

Além disto, obtivemos identico resultado com a inoculação da cultura do outro *Corynebacterium* que isolámos das fezes de um doente. Esse germe mostrou relações immunologicas com a infecção, soffrendo agglutinações em titulos elevados, com os sôros de convalescentes e de macacos immunizados, como já assignalámos em paginas anteriores.

Dos resultados obtidos com este germe, FH4, (*Corynebacterium paraicteroides*) descrevemos o seguinte:

Macacus rhesus 60 - Inoculado por via sub-cutanea, em 29-VII-1929, com 5 cc. de cultura em caldo glycosado, de 48 horas, do *Corynebacterium FH4* (cultura após 5 meses do isolamento). Não apresentou reacção febril, nem outro symptoma qualquer e em 30-VIII-1929 foi inoculado com o virus amarillico (emulsão de figado do *rhesus* 66) seguramente activo, com testemunha positivo (*rhesus* 69). No 4.º dia após esta inoculação, a temperatura esteve a 39°,6 e 39°,8; no dia seguinte, 39°,9 e 39°,3, mantendo-se depois em media normal ao nivel de 39° durante longa observação. Assim, pois, o *rhesus* parece ter tido uma infecção benigna em relação ao virus activo, resistindo á sua acção.

Resultado mais ou menos semelhante obtivemos com outro *rhesus* (n.º 19) que recebeu varias inoculações do FH4 (de cultura mais recente) entre as quaes a 2.ª determinou reacção febril; o animal resistiu a uma inoculação do virus amarillico, feita mais de 3 meses depois.

Estes resultados e os que descrevemos a seguir, nos autorizam a explicar o facto como devido a um poder antigenico não especifico destes germes (*Corynebacterium*), os quaes têm, possivelmente, seu biotropismo exaltado, como já accentuámos, por influencia do virus invasor, motivo pelo qual agiriam augmentando a resistencia do animal em relação ao virus.

Agglutinação - E' difficil proceder-se a esta reacção com o *Corynebacterium R44s*, visto não ser muito abundante o crescimento do germe nos meios mais adequados para isto. Não utilizámos a gelose-sangue ou gelose-sôro, porque estes elementos alterariam as propriedades do germe nas repicagens, e não forneceriam portanto indicações seguras. Em caldo glycosado, embora o desenvolvimento fosse muito escasso, seria o meio mais adequado para se obterem as emulsões microbianas e este já haviamos utilizado com outro *Corynebacterium* (FH4).

Assim, para a pratica da reacção lançámos mão das culturas em caldo glycosado, centrifugadas, sendo a emulsão dos germes feita em agua distillada e a dos sôros em agua physiologica a 8 ‰, de modo a se ter uma concentração final

de NaCl de 4 $^0/_{00}$, mais favoravel para se obter emulsões estaveis, não auto-agglutinaveis.

Verificámos que o germe apresenta agglutinação em relação a certos sôros e que esta propriedade se modifica com as repicagens, desapparecendo no fim de certo tempo. Por algumas reacções, que praticámos juntamente com J. Travassos, verificámos que de varios sôros examinados, apenas dois, de convalescentes, agglutinavam a emulsão; os outros, tanto de doentes (sôros já antigos), como de *Macacus rhesus* immunizados, não soffreram acção alguma.

A agglutinação manifestada não se manteve nos dias seguintes, após novas repicagens mesmo com o sôro com o qual era a principio observada. Assim, o resultado com um destes sôros, foi o seguinte em 3 verificações:

Em	1-VIII-1929	titulo de agglutinação	1/640 (++)
Em	4-VIII-1929	„ „ „	1/640 (++)
Em	14-VIII-1929	„ „ „	1/20 (++)

A pesquisa de anticorpos fixadores do complemento com antigeno preparado com o *Corynebacterium R44s*, foi negativa.

V - Pesquisas em outros animaes inoculados com o virus

Em outros animaes, alem do *Macacus rhesus*, tambem inoculados com o virus (sangue de *rhesus* infectados) foram feitas algumas verificações no tocante ao isolamento de microorganismo na corrente circulatoria.

Dentre estes animaes, considerados refractarios ao virus, as pesquisas foram feitas em um cão, 3 gatos e 3 cobaias.

Com o cão e as cobaias, que nenhuma reacção apresentaram em consequencia da inoculação do virus, as semeaduras foram feitas com sangue colhido por puncção cardiaca depois de decorridos 7 e 20 dias da inoculação, sendo constantemente negativos os resultados da cultura, em meios, tanto aerobios, como anaerobios.

Resultado negativo obtivémos tambem em 2 gatos. No terceiro gato examinado (gato 1) e que teve reacção febril, sendo a puncção cardiaca praticada nesta occasião (12.º dia), o resultado da cultura foi positivo. Effectivamente, decorridas 48 horas de estufa a 37º, observou-se, somente em caldo glycosado anaerobio (os tubos contendo ao fundo pequenos pedaços de musculo cardiaco e a superficie com uma camada de oleo de vaselina) o desenvolvimento de cultura, com turvação e deposito no fim de alguns dias.

O interesse deste resultado reside em que a cultura pura obtida era de um microorganismo que, por seus caracteres morphologicos e tinctoriaes, se identificava facilmente a um Corynebacterium. Esse germe designamos por *Corynebacterium G 1 s*, para indicar sua origem (sangue do gato 1), como já haviamos feito com o isolado do *rhesus* 44.

Corynebacterium G 1 s - Não faremos, no entanto, uma descripção minuciosa deste microorganismo, porque seu estudo está ainda em andamento, devendo ser objecto de um trabalho posterior. Apenas assignalaremos algumas das suas caracteristicas principaes.

O *Corynebacterium G 1 s* somente se desenvolve em meios anaerobios, de preferencia glycosados. Em gelose sangue, simples e glycosada, em aerobiose, o desenvolvimento, mesmo depois de 2 repicagens, é nullo, não sendo possivel, mesmo com o auxilio de uma lente, verificar a presença de colonias. Não conseguimos, por enquanto, a adaptação do germe neste meio, conforme aconteceu com o anteriormente estudado.

O *Corynebacterium G 1 s* é Gram-positivo, não resistindo, porém, a uma descoloração muito intensa. Corado pelo Giemsa, azul de Loeffler ou pelo Neisser, cada bacillo revela a presença de 2 granulações metachromaticas em situação polar, approximando-se neste aspecto ao microorganismo já citado e descripto por Sellards. Este aspecto é o que se observa na cultura em caldo glycosado anaerobio original; nas das sub-culturas subsequentes, o aspecto é identico, apenas as granulações parecem um pouco menores.

Pathogenicidade e relação com a febre amarella.

Uma cultura em caldo glycosado da 6.ª repicagem foi inoculada, por differentes vias, em cobaias, coelhos e gato, na dose de 1 a 3 cc., e num *Macacus rhesus*, por via peritoneal, na dose de 5 cc.

Em resultado destas inoculações os animaes nada apresentaram de anormal (reacção febril ou outro symptoma), podendo-se concluir pela não pathogenicidade do *Corynebacterium* nas condições experimentaes descriptas. Suas relações com a febre amarella não se evidenciaram, pelo menos a julgar pelo resultado do unico *rhesus* inoculado.

Este (*Macacus rhesus* 113) foi inoculado com aquelle germe em 30-7-30 e, até o momento, decorridos mais de 30 dias, nenhum signal denotou da infecção.

Deante dos resultados assignalados não se pode estabelecer uma relação etiologica entre os *Corynebacterium* estudados, quando em culturas artificiaes, e a febre amarella. O que é certo é que no decurso da infecção experimental é possivel isolar-se germes deste grupo, do sangue dos animaes infectados com o virus, lançando-se mão de meios culturaes especiaes, o mesmo acontecendo com outros animaes inoculados, embora seja muito pequena a porcentagem dos resultados positivos. E' tambem evidente que certas relações immunologicas existem entre os germes deste grupo e a infecção humana e experimental e estas relações, segundo nossas pesquisas, mais se evidenciaram em relação a um typo microbiano do grupo, isolado da flora intestinal de um doente.

Nestas condições, julgamos acertado no momento conservar a conclusão, já emittida em trabalho anterior, de que esses typos de *Corynebacterium* apresentam um provavel "biotropismo" sob a influencia do virus amarillico.

Somente novos estudos, baseados nas idéas modernas sobre a dissociação microbiana e differentes phases da evolução das bacterias, poderão um dia estabelecer definitivamente o verdadeiro papel representado pelos corynebacterios ou, mais particularmente, por algum dos seus representantes no decurso do typho amarillico; esses novos estudos poderão tambem, o que é mais provavel, mostrar que esses microorganismos são meros saprophytas existentes no organismo e cujo "biotropismo" se exaltou sob a influencia do virus; isto viria esclarecer as relações immunologicas, que podem ser observadas entre elles e a infecção, relações essas que seriam de natureza não especifica e devidas a formação de anticorpos collateraes por elles provocada.

SUMMARIO E CONCLUSÕES GERAES

Na introducção mostramos a importancia que apresenta em nossos dias a protobiologia (assim podendo denominar-se o ramo da bacteriologia que estuda os virus chamados filtraveis) e os progressos realizados nestes ultimos annos no estudo destes elementos.

No que diz respeito á febre amarella, a verificação de Stokes, Bauer e Hudson, referente á natureza do agente etiologico, assim como á sensibilidade de um simio asiatico á infecção, representa um novo passo no estudo dos virus, constituindo tambem um dos factos culminantes na historia da febre amarella que, como consequencia, entrou para o terreno verdadeiramente experimental.

Explicamos os motivos da realização dos nossos estudos em Butantan, accrescentando que faremos uma resenha das modernas contribuições á febre amarella experimental, consequentes aos estudos fundamentaes da commissão americana na Africa, e que assignalaremos de preferencia as pesquisas pessoaes que realizámos sobre o assumpto.

O trabalho é dividido em 5 capitulos:

O I trata do virus da febre amarella; o II, dos transmissores e vehiculadores do virus; o III, da anatomia e histologia pathologica na infecção experimental; o IV, da immunologia da febre amarella e, finalmente, o V, das associações microbianas e biotropismo de certos germes no decurso da infecção humana e experimental.

1. O capitulo I é dividido em varias partes, nas quaes são estudados os virus americano, africano, sua identidade, conservação e propriedades e o virus amarillico neurotropico.

Em relação ao virus americano, verifica-se, pelas experiencias descriptas, o isolamento do virus responsavel pela febre amarella no Brasil; esse virus foi isolado em S. Paulo de um doente vindo do Rio de Janeiro já no periodo de incubação do mal. Este virus poude resistir activo, determinando a infecção, depois de ter permanecido em congelação a -8 C. durante 18 dias.

Os *rhesus* apresentaram menor sensibilidade ao virus americano; o periodo de incubação é geralmente mais longo e a infecção pode evoluir, ás vezes, sem elevação thermica.

Dois *rhesus* foram inoculados com sangue do doente, colhido no 1.° dia de febre. Um dos animaes teve a infecção amarillica, conseguindo-se 3 passagens do virus de macaco a macaco, entre as quaes a segunda tambem foi mortal; o outro *rhesus* teve uma infecção benigna, mostrando-se immunizado em relação ao virus africano inoculado posteriormente.

Dois *rhesus* foram inoculados com sangue do doente, colhido no 2.° dia de febre, um resistiu a uma segunda inoculação do virus africano, mostrando-se immunizado; o outro não. Um *rhesus* inoculado com uma mistura de sangue do doente, colhido nos 1.°, 2.° e 3.° dias, apresentou uma infecção atypica, sem elevação de temperatura.

Outro facto que se observa nos resultados experimentaes obtidos é a identidade dos virus responsaveis pela febre amarella entre nós e na Africa. Os *rhesus* que resistiram á infecção com o virus americano mostraram-se, com uma excepção apenas, immunizados em relação ao virus africano, seguramente activo inoculado posteriormente.

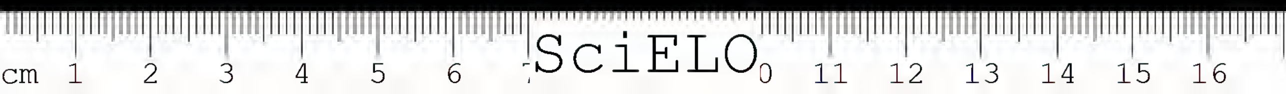
O virus africano estudado foi o da raça Asibi, proveniente de Lagos, Nigeria. O seu comportamento experimental foi estudado em numerosas passagens de macaco a macaco, quer usando o material fresco, *in natura*, quer depois de secco e conservado em condições optimas.

Resultados mais seguros na infecção experimental foram conseguidos com a inoculação de sangue fresco, colhido no periodo de reacção febril do macaco infectado, e com a inoculação de emulsão de figado, colhido após o animal ter sido sacrificado em periodo de hypothermía. A actividade do virus pode apresentar variações decorrentes de diversos factores, entre os quaes tambem se deve collocar a sensibilidade individual dos animaes.

O virus secco, convenientemente obtido e conservado, manteve sua actividade por mais de 3 meses, e determinou, no fim deste prazo, a infecção com evolução caracteristica.

Por motivos varios, o virus pode-se attenuar e, neste caso, apenas determinar reacção febril, quando inoculado; outras vezes, essa reacção pode não existir, sendo a infecção inapparente, porém o animal se mostra immunizado em relação a uma segunda inoculação de virus seguramente activo.

Para o estudo do virus amarillico, indicamos a technica empregada para a contensão, inoculação e sangrias dos *Macacus rhesus*, assim como os meios para a conservação do virus *in natura* e do virus secco no vacuo.



Uma parte de interesse nos estudos realizados sobre as propriedades do virus, é a que se refere á sua resistencia á acção dos antisepticos. Mostramos em pormenor as experiencias realizadas; nellas evidenciamos que o virus africano (figado de *rhesus* infectado) mesmo emulsionado em agua phenolada a 5 °/₀₀ e formolada a 2 °/₀₀, porém mantido em condições optimas ou proximas de temperatura (2°C), é capaz de, mesmo no fim de 27 dias, determinar a infecção com evolução clinica inapparente (comprovada com passagem positiva no fim de 16 dias).

A permanencia em condições desfavoraveis de temperatura durante certo tempo destróe o virus, embora a emulsão conserve suas propriedades antigenicas.

O facto de não se ter conseguido a filtrabilidade do virus, quando no organismo do mosquito, attribuimos ás condições de meio em que as experiencias foram realizadas por outros autores. Se as emulsões dos insectos infectados forem feitas em meios favoraveis, diminuindo os phenomenos physico-chimicos que acarretam a retenção do elemento activo, os resultados serão provavelmente favoraveis, e mostramos os resultados que a respeito obtiveram posteriormente outros pesquisadores.

Assignalamos os ensaios realizados por differentes autores, que mostram a possibilidade da passagem do virus através da pelle e das mucosas, mesmo intactas.

Estudamos, por fim, o virus neurotropico para o camondongo branco, confirmando so trabalhos de Theiler. Mostramos a este respeito as passagens que conseguimos fazer até o momento, tendo observado tambem a infecção amarillica do *Macacus rhesus* pela inoculação do virus depois da 3.ª passagem pelo cerebro do camondongo branco.

II. Em seguida são estudados os transmissores e vehiculadores do virus amarillico, sendo o assumpto encarado sob differentes aspectos. Assignalamos a confirmação, sob o ponto de vista experimental, da transmissibilidade do virus pela picada do *Aëdes aegypti*. As modernas acquisições scientificas sobre a transmissibilidade do virus são revistas: a possibilidade da transmissão do virus por outras especies de *Aëdes*, além do *aegypti* e por mosquitos de outros generos segundo as verificações de Bauer e os mais recentes resultados obtidos por Davis e Shannon; os trabalhos de Aragão e Costa Lima, pelos quaes se verifica a possibilidade de o virus ser vehiculado pelas fezes de *Aëdes aegypti* infectados, da passagem do virus de mosquito a mosquito e da infecção do *Aëdes* macho.

Mostramos depois os resultados das nossas experiencias quanto á possibilidade de o virus amarillico ser vehiculado pelas fezes de percevejos (*Cimex lectularius*). Com effeito, verificamos que percevejos alimentados em *rhesus* infectados e em periodo de reacção febril, eliminam, depois de alguns dias, o virus pelas fezes, que se tornam infectantes e determinam a infecção experimental caracteristica, quando inoculadas em *rhesus* normaes. O tempo de eliminação do virus pelas fezes dos percevejos não deve ser superior a 15 dias, e depende de certas condições, como o tamanho do insecto, a quantidade de sangue infectante ingerida, etc.; deve perdurar, provavelmente, durante todo o tempo em que houver elimi-

nação dos productos oriundos da alimentação. O virus não soffre evolução no organismo do percevejo, nem se multiplica nelle; apenas resiste na sua passagem pelo tubo gastro-intestinal, sendo o insecto, pois, um mero vehiculador.

Sabendo-se que o percevejo, depois de cheio, geralmente defeca no lugar da picada ou em suas proximidades, esta possivel vehiculação do virus tem importancia epidemiologica. Na hypothese de a alimentação anterior ter sido num individuo doente, em periodo propicio, o percevejo poderá depositar, por occasião de uma picada em indivíduo são, fezes que seriam virulentas. O virus, então, atravessaria a pelle, principalmente estando esta irritada como consequencia da picada; isto poderia ainda ser facilitado pelo facto de poder o material ser esfregado pela propria pessôa ao coçar-se por causa do prurido. As experiencias descriptas fallam a favor dessa possibilidade.

Um *rhesus* normal foi inoculado com emulsão de fezes de percevejos, reunidas do 2.º ao 12.º dia após a picada infectante num *Macacus rhesus* em periodo de reacção febril.

A infecção teve evolução clinica caracteristica e confirmação histo-pathologica. Passagens positivas foram conseguidas pela inoculação de sangue, colhido em periodo febril, e de emulsão de figado do macaco assim infectado.

A's vezes pode não existir a infecção clinicamente typica, porém os animaes inoculados com as dejecções emittidas dentro do prazo em que estas poderiam conter o virus mostram-se immunizados em relação a uma segunda inoculação de virus activo.

Deante destas verificações experimentaes é justo que os serviços de prophylaxia amarillica não se descuidem destes insectos (*Cimex lectularius*), por ventura existentes nas habitações de onde são removidos doentes de febre amarella.

E' possivel que, por este mechanismo, outros hematophagos tambem possam vehicular o virus amarillico.

Tal facto que verificamos, assim como os observados por Aragão e Costa Lima (de que as fezes do *Aëdes* são tambem infectantes e que o virus se pode transmittir directamente de mosquito a mosquito) vem explicar certos casos da epidemiologia da febre amarella, até então inexplicaveis.

Mostramos depois o resultado das pesquisas preliminares, que realizamos para a verificação da possibilidade da existencia de depositarios do virus entre os animaes domesticos. As experiencias foram feitas com o cão e, embora não autorizem conclusões definitivas, fazem suppor que durante um certo numero de dias esse animal pode ser um depositario do virus amarillico.

As experiencias com gatos foram mais interessantes sob este ponto de vista. De um destes animaes, inoculado com o virus e que apresentou reacção febril e outros symptomas, colhemos sangue no 12.º dia, obtendo, pela sua inoculação no *Macacus rhesus*, uma infecção amarillica caracteristica.

Segundo indicam as provas de immunização dos *rhesus* inoculados com o sangue de gatos, depois de decorridos 30 dias, é provavel que o virus possa persistir no organismo destes felinos por periodo superior a este prazo.

Assignalamos os resultados semelhantes sob certos pontos de vista, obtidos por Bauer e Mahaffy, com a inoculação de certos macacos africanos.

Accentuamos a importancia que, sob o ponto de vista epidemiologico da febre amarella, possam ter os resultados experimentaes obtidos e a necessidade do proseguimento destes estudos sob outras condições.

III. Em relação á anatomia e histologia pathologica, nos limitamos a transcrever os laudos dos exames histo-pathologicos, praticados pelo dr. Juvenal R. Meyer, em material de *rhesus* inoculados com fezes de percevejos infectados. Estes laudos confirmam a infecção amarillica assim obtida e, portanto, os resultados experimentaes que assignalamos no capitulo anterior.

IV. Depois são estudados varios aspectos do problema da immunologia da febre amarella. De inicio mostramos a importancia destes estudos, não só sob o ponto de vista scientifico, como tambem do ponto de vista pratico, no que diz respeito ao diagnostico da infecção e preparo de elementos com que se poderá combater o mal.

A respeito da vaccinação preventiva, estudamos as differentes technicas para o preparo da vaccina: technica de Hindle, technica de Aragão e a technica que empregamos.

Como consequencia de estudos experimentaes e pelos resultados obtidos no preparo da vaccina contra outros virus (*rinder-pest*), empregamos o chloroformio como elemento para a attenuação ou destruição do virus nas emulsões vaccinicas.

A technica para o preparo da vaccina amarillica, segundo o methodo que preconizamos, é dada em todos os seus pormenores. Mostramos ainda os resultados experimentaes que obtivemos e pelos quaes se evidencia a innocuidade da vaccina e o poder protector dos *rhesus* em relação ao virus amarillico seguramente activo.

Referimo-nos ao sôro anti-amarillico de Pettit e seus collaboradores, assim como ao que obtivemos pela immunização de um cavallo, não depositando, entretanto, grandes esperanças nesse meio therapeutico.

Em relação ao diagnostico da febre amarella mostramos a importancia de poder ser elle estabelecido com segurança ainda em vida do doente, principalmente no inicio das epidemias e nas formas frustras do mal, quando apresenta clinicamente grandes difficuldades.

Dos methodos de laboratorio que surgiram como consequencia dos modernos estudos assignalamos, em primeiro lugar, as reacções baseadas no desvio do complemento. Mostramos a nova technica que estudamos juntamente com J. Travassos, nosso companheiro de trabalho e cujos resultados são os mais animadores possiveis. Este methodo se baseia no emprego de um antigeno amarillico (figado de macaco infectado, tratado sob certas condições) de grande especificidade, e pela leitura da reacção praticada com um numero crescente de unidades complementares comparada com a do testemunha do sôro, com numero identico de unidades complementares, quando os sôros são dotados de propriedades anti-complementares.

Pelos resultados obtidos, a reacção poderá servir para o diagnostico da infecção, tanto humana, como experimental, mas principalmente para a verificação dos convalescentes e dos *rhesus* immunizados. Outra vantagem, decorrente dos estudos praticados com sôros de naturaes do paiz, residentes em zonas onde o mal tem surgido, e de extrangeiros recemchegados e sensiveis, é que poderá fornecer indicações sobre as pessoas naturalmente immunizadas e as que não o são, servindo, portanto, para seleccionar os individuos que necessitam da vaccinação preventiva contra a febre amarella.

Os sôros dos nacionaes normaes e residentes em zonas onde o mal é endemico (Bahia), apresentam, na proporção de quasi 50 %, anticorpos fixadores do complemento, ao passo que os de extrangeiros recemchegados dão resultados sempre negativos.

Por conseguinte, o estabelecimento do diagnostico, pelo desvio do complemento, no primeiro grupo, deve ser cercado de certas reservas, conforme, aliás, tambem deve acontecer quando se recorre á prova do poder protector dos sôros em relação á infecção experimental, porquanto aquelles soros se mostram capazes de proteger o *Macacus rhesus*, desde que sejam tambem dotados de anticorpos fixadores.

Assignalamos, em seguida, a reacção de Costa Cruz, baseada na dosagem da alexina, que é diminuida na febre amarella em evolução; as modificações da coagulação sanguinea estudadas por Vellard e Vianna e finalmente a reacção que estudamos, baseada na agglutinação não especifica, manifestada por certo *Corynebacterium* em relação aos sôros de doentes, convalescentes e de *Macacus rhesus* experimentalmente infectados.

V. No capitulo V estudamos uma face interessante do problema da febre amarella, que trata das associações microbianas e do biotropismo de certos germes sob a influencia do virus amarillico. O assumpto é tratado de um modo geral á luz dos conhecimentos modernos sobre os phenomenos de dissociação microbiana, mutações e formas filtraveis das bacterias. De um modo mais especial e em virtude das experiencias pessoaes, estudamos o problema das associações microbianas e o biotropismo dos *Corynebacterium* sob a influencia do virus, facto que provoca no organismo a formação de anticorpos collateraes, que podem ser evidenciados.

Mostramos depois os resultados obtidos por Kuczynski, e as verificações de Costa Cruz relativas ao *Bacillus hepato-dystrophicans*, considerado um *Corynebacterium*.

Finalmente, descrevemos nossos resultados experimentaes sobre a pesquisa de microorganismo no sangue dos *Macacus rhesus* infectados e de outros animaes inoculados. Assim é que conseguimos isolar dois typos de *Corynebacterium*, cujos caracteres e propriedades são estudados; pelo comportamento experimental

destes germes apenas confirmamos nossa conclusão anterior de que microorganismos desse grupo poderão ter o seu biotropismo exaltado sob a influencia do virus amarillico.

*

* *

Concluindo este trabalho sobre os modernos conhecimentos a respeito da febre amarella experimental e os estudos que realizamos em Butantan desde principios de 1929, desejamos expressar o nosso agradecimento a todos os companheiros de trabalho no Instituto, particularmente a J. B. Arantes, J. Travassos e R. Godinho, pelo constante auxilio que nos prestaram, e a J. R. Meyer, do Instituto Biologico.

Ainda todo o nosso reconhecimento aos prezados mestres prof. H. da Rocha Lima e H. de B. Aragão, a cujo saber e experiencia muitas vezes recorremos e, muito especialmente a Afranio do Amaral que, facilitando as nossas pesquisas com o material e apparelhamento necessarios, assim como pelos seus conselhos e orientação, vem cumprindo tambem um dos pontos capitaes da sua actual e proveitosa administração em Butantan: o estudo dos problemas relacionados com a pathologia humana e que mais de perto interessam a nossa nosologia.

"ESTUDOS SOBRE A FEBRE AMARELLA
Modernos conhecimentos sobre a infecção experimental"

by

J. LEMOS MONTEIRO

SUMMARY

ABSTRACT AND CONCLUSIONS

The A. first shows the importance borne nowadays by protobiology, that branch of bacteriology dealing with the filterable viruses. This is shown by the progress recently made in the study of these organisms, especially in regard to yellow fever as proven by the work done by Stokes, Bauer and Hudson concerning the nature of its etiological factor and the susceptibility of an Asiatic monkey to it. Both of these facts represent important steps in the history of yellow fever which has definitely entered into the experimental stage.

This monograph based on various experimental investigations made at the Instituto Butantan begins with a revision of many recent observations on experimental yellow fever as derived from the fundamental work done by the American Commission in West Africa. The present contribution is divided into 5 chapters: chapter I dealing with the yellow fever virus; chapter II, with hosts and carriers of the virus; chapter III, with the pathological feature of experimental yellow fever; chapter IV, with immunity in yellow fever; chapter V, with bacterial association and biotropism of certain germs isolated in the course of the disease, both human and experimental.

I - The first chapter is divided into several sections in which the characters of the virus, of both the African and the American strains, are discussed together with their identity, properties and means of preservation. The American strain was the one responsible for the late epidemics of yellow fever in Rio, whence a

patient in the incubation period of the disease came to São Paulo. The virus isolated from this patient, after having been kept in ice box at -8°C. for 18 days, caused the infection of a *rhesus* monkey.

However, upon inoculation, specimens of *Macacus rhesus* proved to be less sensitive to the American virus, than to the African, the incubation period of the former in general being longer and the infection induced by it sometimes developing no fever.

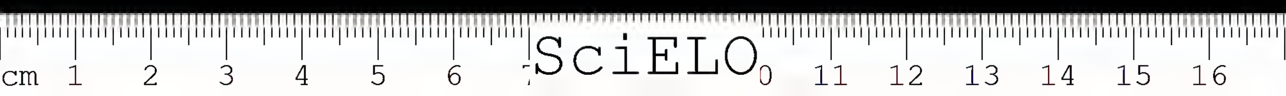
Of two monkeys inoculated with that patient's blood taken on the first day of fever, one developed a typical infection which enabled three successive transfers of the virus from monkey to monkey, the second transfer also being fatal, whilst the other developed a mild infection and resisted a later inoculation of the African virus.

Of two *rhesus* inoculated with human blood taken on the second day of fever, one resisted a further inoculation with the African virus, thus showing to have become immune, whilst the other did not resist it. A *rhesus* inoculated with a mixture of blood taken from the same patient on his first, second and third days of fever, developed an atypical infection characterized by absence of fever. With only one exception all the *rhesus* injected with the American strain resisted further inoculations with the highly virulent African strain, a fact which confirms the identity of these two strains.

The action of the African strain (Asibi strain), isolated in Lagos, Nigeria, was investigated, through numerous transfers from monkey to monkey, by using virulent material either fresh or dried and preserved under optimal conditions. Best results were secured in the attempts to experimentally reproduce the infection by using either fresh blood taken in the course of the febrile period from an infected monkey or an emulsion of liver taken from a monkey killed during the latest or hypothermic period of infection. Several facts appear to influence the activity of the virus, and there seem to exist some individual variations in the susceptibility of the *rhesus* to the virus.

The dried virus, if conveniently prepared, was active after three months of preservation, then being still able to cause a typical infection. The activity of the virus becomes attenuated under various conditions so as to cause but a febrile reaction on inoculation; sometimes, however, this reaction does not appear (non-apparent infection) but the monkey becomes immune to a further inoculation of the active virus.

The A. describes the technic he used in holding, injecting and bleeding the *rhesus* monkeys as well as in preserving the virus both *in natura* and after dessication in the vacuum. In the light of the experiments made, the resistance of the virus to antiseptics is very interesting: an emulsion made in water with the liver of a *rhesus* infected with the African strain plus 0.5 % phenol and 0.2 % formalin and kept under optimal or nearly optimal conditions (2°C.), was able, even at the end of 27 days, to bring about the infection, clinically non-apparent,



yet proved by a positive transfer of the virus to another monkey, this being inoculated with the 16 day-old liver emulsion.

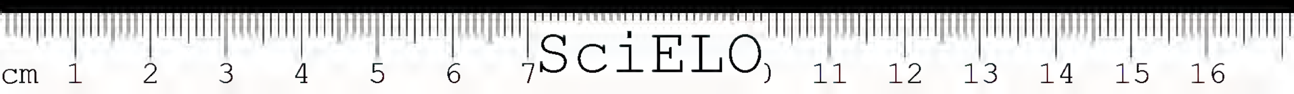
Keeping the virus for some time under unfavourable temperature conditions is detrimental to the maintenance of its virulence but not to the retention of its antigenic power.

The unfilterability of the virus when this is found in the body of the mosquito seems to be due to some improper conditions under which the various investigators have tried the experiment. That the virus is filterable while in the mosquito is anticipated, provided that some precautions be taken to diminish the influence of the physico-chemical phenomena responsible for the retention of the virus by the candle. In this connexion the results obtained by Bauer and Mahaffy are quoted as compared with those obtained by the A. in the filtration of the cow pox virus (vaccine virus) when found in a proper medium such as glucose broth, pH = 8.0. The penetrability of the virus through the normal skin and the mucous membranes confirms what has been demonstrated in this respect by numerous experiments conducted by previous investigators.

Finally, Theiler's experiments on white mice are confirmed by the successful inoculation of *rhesus* with the neurotropic virus from the 3rd. transfer through mice.

II - In the second chapter, concerning hosts and carriers of the yellow fever virus, the transmission by the sting of the *Aëdes aegypti* is cited, while other features of our newer knowledge of the virus propagation in nature are also reviewed, special reference being made to the following topics: transmission of the virus both by species of *Aëdes* besides *aegypti* and by mosquitoes of other genera as verified by Bauer and still more recently by Davis and Shannon; possibility of the virus being carried by the faeces of infected *Aëdes aegypti* or being transferred from mosquito to mosquito and even from a female mosquito to a male as found by Aragão and Costa Lima.

Several experiments are described in detail to show the possibility of the virus also being carried by the faeces of bed-bugs (*Cimex lectularius*). Bed-bugs fed on monkeys infected with yellow fever during the febrile period, a few days later begin eliminating the virus with their faeces; these become so virulent as to cause a typical infection when experimentally injected into normal *rhesus*. The period of the virus elimination by the bed-bug faeces seems not to last over 15 days and depend upon such conditions as the insect size, amount of infected blood sucked etc.; it is very likely to last only so long as the excretion of the infected faeces goes on. Anyway, the virus appears not to undergo any evolution nor to multiply in the bed-bug body, but it resists passing through the intestines of this insect. For this reason it is assumed that the bed-bug may serve as a carrier to the virus. Indeed, it is known that after its feeding the bed-bug usually excretes on the site of its sting or near it so as to represent a rôle of certain importance in the epidemiology of yellow fever. Should the previous feeding of



a bed-bug be made on a yellow fever patient during the septicaemic period, the faeces excreted by it while feeding on another person may then leave the virus on the site of the latter sting. In the light of the experiments made, this mechanism explains how the virus may penetrate into the system after crossing the skin, an action which seems to be favoured both by the irritation caused by the sting itself and by the scratching made by the patient.

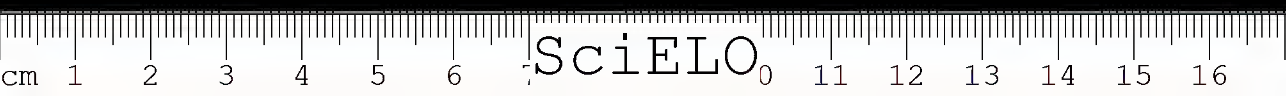
A normal *rhesus*, inoculated with an emulsion of bed-bug faeces, secured from the 2d to the 12th day following the bug feeding on another infected and feverish *rhesus*, developed a typical infection confirmed after death by the presence of specific histological lesions. Successful transfers were also obtained afterwards through the inoculation of both the blood taken in the febrile period and the emulsion of the liver of this monkey. Sometimes the infection does not follow a typical course, yet the animals which have been inoculated with faeces probably contaminated with the virus, show immunity to further inoculation with the active virus.

It is necessary to bear in mind all these observations at the time of epidemics of yellow fever, and include into its prophylaxis the destruction of any bed-bugs which may be found in the houses whence patients of yellow fever have been removed.

It is possible that other blood-sucking insects will carry the virus in the same way as described for the bed-bug. Anyhow, this fact together with those observed by Aragão and Costa Lima in regard to both the infectiveness of the *Aëdes* faeces and the direct transmissibleness of the virus from mosquito to mosquito, may explain certain features in the epidemiology of yellow fever which have been found rather puzzling.

Various attempts were made to discover carriers of the virus among domestic animals. From some preliminary experiments made on the dog it seems indicated to assume that this animal may keep the virus in its body for at least a few days. Experiments made on cats proved to be still more interesting. Blood taken from a cat on the 12th day of a febrile infection as brought about by the inoculation of active virus, caused a typical yellow fever infection in a normal *rhesus*. Furthermore, the virus may keep in the body of the cats for over one month as shown by the immune reactions borne by monkeys inoculated with cat's blood taken 30 days after the infection. These results although based upon observations made on domestic animals, morphologically unrelated to the simia, seem to corroborate those obtained by Bauer and Mahaffy with the inoculation of certain African monkeys.

In view of the importance of the rôle played by all these animals in the epidemiology of yellow fever it seems advisable to continue with these investigations to throw further light on the mechanism of the preservation and transmission of the yellow fever virus under natural conditions.



III - In regard to the pathological feature of experimental yellow fever, as shown in the third chapter only the histological lesions found in monkeys inoculated with virulent faeces of infected bed-bugs, were examined by Dr. J. R. Meyer, whose protocols confirmed the infection and thus the diagnosis made and the conclusions reached at, in the course of this study.

IV - The fourth chapter concerns various immunological aspects of yellow fever which were also investigated with a view to finding some new method scientifically sound and easy to apply, that might, on the one hand, be efficacious in combating the disease and, on the other hand, help in the establishment of its diagnosis.

In connexion with the prophylaxis of yellow fever by means of vaccines, an analysis is made of the various technics used in their preparation such as Hindle's, Aragão's and the Author's. Based on various observations on the virus resistance to antiseptics and also on one of the methods of preparation of rinder-pest vaccine, chloroform was used as a means of attenuating or rather destroying the virus in the vaccine. The technic employed in the preparation of the chloroform vaccine is given in detail as well as the results obtained by its application showing it to be innocuous and capable to protect a *rhesus* monkey against a further inoculation with the active virus.

Reference is made to the anti-yellow fever serum as prepared by Pettit and his co-workers and by the A. who, however, does not trust much its efficacy.

As regards the diagnosis, it is most important that it be definitely established while the patient is still alive especially in the beginning of epidemics and also in cases of the mild form of the infection. Since clinical diagnosis of these cases is virtually impracticable, various methods have been tried to solve the problem.

Among the laboratory methods developed in the course of the late epidemics of yellow fever, complement fixation seems to be one of the most trustworthy. This method was applied by the A., in collaboration with J. Travassos, with the most successful results. It is based in the use of a specific antigen prepared from livers secured from infected monkeys and triturated under special physical conditions. From the results obtained, the complement fixation test seems to serve as a safe method to be applied in the diagnosis of yellow fever either human or experimental and most particularly in the discovery of persons convalescing from, or *rhesus* monkeys recently immunized against, the infection. The sera of normal natives living in cities like Bahia where yellow fever has been more or less endemic for some time show complement fixing antibodies in a proportion as high as 50 %, whilst those of newly arrived foreigners give negative results in all cases. This fact indicates that the application of the complement fixation reaction in places where yellow fever is endemic must be resorted to with certain precautions to avoid errors. No doubt even the proof based on the protecting power of the serum in regard to the experimental infection is liable



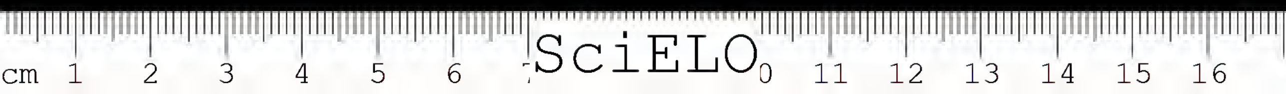
of misleading results in endemic centers because those sera which may protect the *rhesus* usually bear complement fixing antibodies.

Other laboratory methods applicable to the diagnosis are reviewed: the determination of the alexine which is lowered in the course of yellow fever, as found by Costa Cruz; the modifications in the blood coagulation, as investigated by Vellard and Vianna and, finally, the non-specific agglutination of a *Corynebacterium* in presence of serum from either convalescents or *rhesus* experimentally infected.

V - The fifth chapter concerns another interesting feature of yellow fever, e.g., the bacterial association and the biotropism of certain germs in presence of the yellow fever virus. This subject is dealt with in the light of our newer knowledge of the evolution of bacteria, their dissociation, mutation and filterable stage, particularly emphasizing the rôle played by the Corynebacteria under the influence of the virus, a fact that brings about the presence of collateral antibodies in the blood.

Kuczynski's investigations on his *Bacillus hepato-dystrophicans* are discussed, quoting Costa Cruz' view who regards this germ as a *Corynebacterium.*

Finally, various experiments are described about the presence of microorganisms in the blood of infected monkeys (*Macacus rhesus*) and other animals experimentally inoculated with the virus. Two types of bacteria were thus isolated and proved to belong in the genus *Corynebacterium;* their behaviour confirmed the previous observation concerning the biotropism exaltation of these germs under the influence of the yellow fever virus.

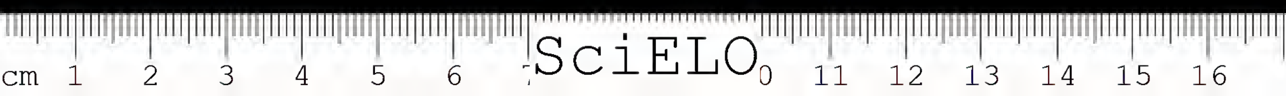


BIBLIOGRAPHIA

Esta bibliographia encerra referencias a numerosas publicações, posteriores, não somente aos trabalhos fundamentaes de Stokes, Bauer e Hudson, mas tambem, em parte, ás proprias pesquisas discutidas no texto. Deste modo ficará facilitada a tarefa daquelles que desejarem fazer estudos sobre a febre amarella experimental á luz dos modernos conhecimentos.

1. *Agramonte, A.* — Consideraciones acerca del agente etiologico en la fiebre amarilla. Sciencia Medica VI(6).1928.
2. *Aragão, H. de B.* — Observações sobre a febre amarella no Brasil. Brasil Medico XLII(27).1928.
3. *Aragão, H. de B.* — Etiologia da febre amarella. Folha Medica IX(18).1928.
4. *Aragão, H. de B.* — Relatorio a respeito de algumas pesquisas sobre a febre amarella. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (2).1928.
5. *Aragão, H. de B.* — Récherches sur la fièvre jaune. C. R. Soc. Biologie XCIX(30). 1928.
6. *Aragão, H. de B.* — Possibilidade da infecção de *Aëdes aegypti* machos com virus da febre amarella. C. R. Soc. Biol. CII(29).1929. Brasil Medico XLIII(24).1929.
7. *Aragão, H. de B.* — Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitos infectados. Brasil Medico XLIII(24).1929.
8. *Aragão, H. de B.* — Possibilidade da propagação directa da febre amarella de stegomyia a *Aëdes aegypti* sem intervenção do homem. Brasil Medico XLIII(31).1929 et C. R. Soc. Biol. CII(29).1929.
9. *Aragão, H. de B.* — Modernas acquisições sobre a febre amarella experimental. Arch. de Hygiene III(2).1929.
10. *Aragão, H. de B.* — Yellow fever virus: transmission of Brazilian strains to *Macacus rhesus* and *Macacus cynomolgus*: preliminary report. J. A. M. A. XCII(7).1929.
11. *Aragão, H. de B.* — Infecção do *Aëdes aegypti macho* e possibilidade da propagação da febre amarella de *Stegomyia* a *Stegomyia* sem passagem pelo homem. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (9).1929.
12. *Aragão e Costa Lima* — Sobre a transmissão da febre amarella pelas fezes de mosquitos infectados. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (8).1929.
13. *Aragão e Costa Lima* — Sobre a infecção de *Macacus rhesus* pela deposição de fezes de mosquitos infectados sobre a pelle ou na conjunctiva ocular integras. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (9).1929, C. R. Soc. Biol. CII(29).1929 et Rev. Med. Cir. do Brasil XXXVII(10).1929.

14. *Aragão* e *Costa Lima* — Sobre o tempo necessario para que *Stegomyias* infectados excretem fezes virulentas. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (9).1929, Rev. Med. Cir. do Brasil XXXVII(10).1929 et C. R. Soc. Biol. CII(29).1929.
15. *Aragão* e *Costa Lima* — Sobre o poder infectante da haemolympha de mosquitos contaminados com o virus da febre amarella. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (10).1929.
16. *Aragão* e *Costa Lima* — Novas experiencias sobre a febre amarella. Mem. Inst. Oswaldo Cruz XXIII(2).1930.
17. *Aragão, H. de B.* et *Costa Lima, A. da* — Nouvelles expériences sur la fièvre jaune. Quantité de virus chez le moustique. C. R. Soc. Biol. CIV(20).1930.
18. *Araujo, E. de* — O problema da etiologia da febre amarella (Estudo analytico). Brasil Medico XLII(29).1928.
19. *Barbosa, P.* — Pequena historia da febre amarella no Brasil. Arch. de Hygiene III(1).1929.
20. *Barreto, J. de B.* — Notas epidemiologicas sobre a febre amarella. Arch. de Hygiene III(1).1929.
21. *Barreto, J. de B.* e *Peryassú, A. Gonçalves* — Da aspersão de insecticidas na prophylaxia da febre amarella. Brasil Medico XLIII(13).1929 et Arch. de Hygiene III(1).1929.
22. *Barreto, J. de B.* — Febre amarella, difficuldade da campanha. Arch. de Hygiene III(1).1929.
23. *Barroso, S.* — A febre amarella no oeste africano. Brasil Medico XLII(37).1928.
24. *Barroso, S.* — Febre amarella. Pontos controversos. Brasil Medico XLII(44).1928.
25. *Barroso, S.* — Febre amarella. Pontos controversos. II. Brasil Medico XLII(45). 1928.
26. *Barroso, S.* — O problema da febre amarella no Brasil. Brasil Medico XLIII(21). 1929.
27. *Barroso, S.* — O problema da febre amarella no Brasil. A lição dos factos. Brasil Medico XLIII(17).1929.
28. *Bauer, J. H.* and *Hudson, N. P.* — Passage of the virus of yellow fever through the skin. Amer. J. Trop. Med. VIII(5).1928.
29. *Bauer, J. H.* and *Hudson, N. P.* — The incubation period of yellow fever in the mosquito. J. Exp. Med. XLVIII(1).1928.
30. *Bauer, J. H.* — The transmission of yellow fever by mosquitoes other than *Aëdes aegypti*. Amer. J. Trop. Med. VIII(4).1928.
31. *Bauer, J. H.* and *Mahaffy, A. F.* — The susceptibility of African monkeys to yellow fever. Amer. J. Hyg. XII(1).1930.
32. *Bauer, J. H.* and *Mahaffy, A. F.* — Studies on the filtrability of yellow fever virus. Amer. J. Hyg. XII(1).1930.
33. *Bauvallet, H.* — Index stegomyia et fièvre jaune. Bull. Soc. Path. Exotique. XXI(4). 1928.
34. *Beeuwkes, H., Bauer, J. H.* and *Mahaffy, A. F.* — Yellow fever endemicity in West Africa with special reference to protection tests. Amer. J. Trop. Med. X(5).1930.
35. *Beunokes, H.* — Recent studies in yellow fever. Nota apresentada á Conferencia sobre a febre amarella em Dakar (21-IV a 1-V-1928).
36. *Buchanan, G. S.* — La fièvre jaune dans l'Afrique occidentale britanique. Bull. Off. Intern. Hyg. Publ. XX(6).1928.
37. *Bunau, V. P.* — La verdunisation dans la lutte contre la fièvre jaune. C. R. Acad. Sc. CLXXXVII(22).1928.
38. *Caldas, M.* — II. A febre amarella. A Tribuna Medica XXXIII(6).1929.
39. *Cannel, O. E.* — Myocardial degenerations in yellow fever. Amer. J. Path. IV (5).1928.

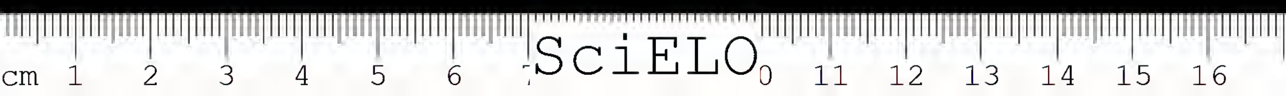


40. *Carbonell, M. V.* — El problema de la fiebre amarilla. Semana Medica XXXV(37). 1928.
41. *Cazanove, F.* — La fièvre jaune des enfants. Bull. Soc. Path. Exotique XXII(3). 1929.
42. *Cazanove, F.* — Le diagnostic prophylactique et les symptômes dans les premières phases de la fièvre jaune. Bull. Soc. Path. Exotique XXII(6).1929.
43. *Cazanove, F.* — Etudes sur la fièvre jaune. Bull. Soc. Path. Exotique XXII(9).1929
44. *Chagas, C.* — Sur la récente éruption de la fièvre jaune à Rio de Janeiro. Bull. Off. Intern. Hyg. Publ. XX(10).1928.
45. *Chagas, C.* — La fièvre jaune. Recherches expérimentales effectuées à l'Institute Oswaldo Cruz (Conferencia). Bull. Soc. Path. Exotique XXII(6).1929.
46. *Chagas, E.* — Syndrome surrénal dans la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(34). 1928.
47. *Costa Cruz, J. da* — Teneur du sérum en alexine dans la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. CI(24).1929.
48. *Costa Cruz, J. da* — Diagnostic de la fièvre jaune par le dosage de l'alexine. C. R. Soc. Biol. CI(24).1929.
49. *Costa Cruz, J. da* — Sobre a etiologia da febre amarella (*B. hepato-dystrophicans*, Kuczynski, 1929). Communicação á Soc. Bras. Biol. (Sessão 25-IX-1929), Rev. Med. Cir. do Brasil XXXVII(10).1929 et C. R. Soc. Biol. CII(31).1929.
50. *Costa Cruz, J. da* — Diagnostico sorologico da febre amarella. Folha Medica X(13). 1929.
51. *Costa Cruz, J. da* — O diagnostico da febre amarella pela dosagem da alexina. Brasil Medico XLIV(8).1930 et Mem. Inst. Oswaldo Cruz XXIII(3).1930.
52. *Costa Cruz, J. da* — Sur un cas curieux de fièvre jaune au point de vue du diagnostic par le dosage de l'alexine. C. R. Soc. Biol. CIV(20).1930.
53. *Cowdry, E. V.* and *Kitchen, S. F.* — Intranuclear inclusions in yellow fever. Amer. J. Hyg. XI(2).1930.
54. *Cunha, A. M. da* e *Muniz, J.* — Notas sobre a febre amarella. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (2).1928.
55. *Cunha, A. M. da* e *Muniz, J.* — Transmission de la fièvre jaune au *Macacus rhesus*. C. R. Soc. Biol. XCIX(34).1928.
56. *Cunha, A. M. da* e *Muniz, J.* — La fièvre jaune et *Leptospira icteroides*. C. R. Soc. Biol. XCIX(34).1928.
57. *Cunha, A. M. da* e *Muniz, J.* — Note about experimental yellow fever. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (5).1929.
58. *Cunha, A. M. da* e *Muniz, J.* — Note sur la fièvre jaune expérimentale. C. R. Soc. Biol. C(11).1929.
59. *Cunnigham, J.* — A new technique for handling infected monkeys. Indian J. Med. Res. XVI(4).1929.
60. *Davis, N. C.* — Studies on South American yellow fever. II. Immunity of recovered monkeys to African virus. J. Exp. Med. XLIX(6).1929.
61. *Davis, N. C.* — Susceptibility of Capuchin (Cebus) monkeys to yellow fever virus. Amer. J. Hyg. XI(2).1930.
62. *Davis, N. C.* and *Burke, A. W.* — Studies on South American yellow fever. I. The strains of virus in use at yellow fever laboratory in Bahia, Brazil. J. Exp. Med. XLIX(6).1929.
63. *Davis, N. C.* and *Shannon, R. C.* — Studies on South American yellow fever. III. Transmission of the virus to Brazilian monkeys. Preliminary observations. J. Exp. Med. L(1).1929.

64. *Davis, N. C.* and *Shannon, R. C.* — Studies on yellow fever in South America. IV. Transmission experiments with *Aëdes aegypti*. J. Exp. Med. L(6).1929.
65. *Davis, N. C.* and *Shannon, R. C.* — Studies on yellow fever in South America. V. Transmission experiments with certain species of *Culex* and *Aëdes*. J. Exp. Med. L(6).1929.
66. *Davis, N. C.* and *Shannon, R. C.* — The location of yellow fever virus in infected mosquitoes and the possibility of hereditary transmission. Amer. J. Hyg. XI (2).1930.
67. *Davis, N. C.* — The transmission of yellow fever. Experiments with the "woolly monkey" (*Lagothrix lagotricha* Humboldt), the "spider monkey" (*Atelus ater* Cuvier), and the "squirrel monkey" (*Saimiri scireus* Linnaeus). J. Exp. Med. LI(5).1930.
68. *Dinger, J. E.* — Experimentelle Untersuchungen über Gelbfieber. Archiv f.Schiffs Trop-Hyg. XXXIII(3).1929.
69. *Dinger, J. E., Schüffner, W. A. P., Snijders, E. P. & Swellengrebel, N. H.* — Yellow fever research in Holland. Nederl. Tijdschr. v. Geneesck. LXXIII(38-51).1929.
70. *Ferrari, A.* — A urologia na febre amarella. (Estudos realizados no Hospital de São Sebastião). Brasil Medico XLIII(20).1929.
71. *Ferrari, A.* — Tratamento da febre amarella. Brasil Medico XLIII(24).1929.
72. *Fialho, A.* — Contribuição ao estudo da anatomia pathologica da febre amarella. Arch. de Hygiene III(1).1929.
73. *Fialho, A.* — Diagnostico anatomo-pathologico da febre amarella. Jornal dos Clinicos IX(13).1928.
74. *Fialho, A., Bicalho, N.* e *Pacheco, G.* — Doseamento dos lipoides no figado humano no curso da febre amarella. Brasil Medico XLII(49).1928.
75. *Fonseca, O. da* — Febre amarella e mosquito. Sciencia Medica VI(11).1928.
76. *Fonseca F.°, O. da* — Estado actual da questão da etiologia da febre amarella. Folha Medica IX(2).1928.
77. *Fraga, C.* — The yellow fever epidemic at Rio de Janeiro. League of Nations Monthly Epidemiol. Rep. VII(10).1928 et Public Health Rep. XLIII(47).1928
78. *Fraga, C.* — Sobre o surto epidemico da febre amarella no Rio de Janeiro. Bol. Off. Sanit. Panamericano VII(12).1928.
79. *Fraga, C.* — O surto de febre amarella no Rio de Janeiro. Rev. Med. Cir. do Brasil XXXVI(8).1928.
80. *Fraga, C.* — Quelques notes sur l'épidémie de fièvre jaune à Rio de Janeiro. 1928. Bull. Acad. Med. CI(2).1929.
81. *Fraga, C.* — Febre amarella no Norte do Brasil e remuneração dos profissionaes da Saude Publica. Arch. de Hygiene III(1).1929.
82. *Frobisher Jr., M.* — The complement fixation test in yellow fever. Reprinted from the Proc. Soc. for Exp. Biol. & Med. XXVI.1929.
83. *Frobisher Jr., M.* — Properties of yellow fever virus. Amer. J. Hyg. XI(2).1930.
84. *Hanson, H.* — Observations on the age and sex incidence of deaths and recoveries in the yellow fever epidemic in the department of Lambayeque, Perú, in 1921. Amer. J. Trop. Med. IX(4).1929.
85. *Hindle, E.* — Filterable viruses. Proc. Royal Soc. Med. XXII.1929 (Section Trop. Dis. and Parasit. :27-30).
86. *Hindle, E.* — A yellow fever vaccine. Brit. Med. J. 1(3518).1928.
87. *Hindle, E.* — An experimental study of yellow fever. Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hyg. XXII(5).1929.
88. *Hindle, E.* — The duration of yellow fever immunity. Lancet CCXIII(5557).1930.
89. *Hndle, E.*, and *Findlay, G. M.* — The electrical change of yellow fever virus. Brit. J. Exp. Path. XI(2).1930.

90. *Hoffmann, W. H.* — The anatomical diagnosis of yellow fever J. Trop. Med. & Hyg. XXXI(1).1928.
91. *Hoffmann, W. H.* — Die Leber beim afrikanischem Gelbfieber. Virchows Arch. f. Path. Anat. u. Physiol. CCLXVI(3).1928.
92. *Hoffmann, W. H.* — Die stille Feiung beim Gelbfieber. Munch. Med. Woch. LXXV (15).1928.
93. *Hoffmann, W. H.* — El diagnostico histopatologico de la fiebre amarilla. Sciencia Medica VI(4).1928.
94. *Hoffmann, W. H.* — The diagnosis of endemic yellow fever. Amer. J. Trop. Med. VIII(6).1928.
95. *Hoffmann, W. H.* — Einschlusse in den Leberkernen beim menschlichen Gelbfieber. Archiv. f.Schiffs Trop.-Hyg. XXXIII(8).1929.
96. *Hoffmann, W. H.* — On the nature of the inclusion bodies in yellow fever. Med. J. & Record CXXXI(6).1930.
97. *Hoffmann, W. H.* und *Jahnel, F.* — Nachforschungen nach der Gelbfieberspirochäte Noguchis in Organen von an afrikanischen Gelbfieber verstorhenen Menschen. Munch. Med. Woch. LXXV(50).1928.
98. *Hoffmann, W. H* — Über die Aetiologie des Gelbfiebers. Berichte der kaiserlich deutsch Akad. Naturf. zu Halle V(17).1929.
99. *Hoffmann, W. H.* — Die immunitätsverhältnisse beim Gelbfieber und ihr Einflutz auf die Epidemiologie. Sep. Immunität, Allergie und Infektionskrankheiten I(12). 1929.
100. *Hoffmann, W. H.* — African yellow fever. Med. J. & Record CXXVIII(4).1928.
101. *Hudson, N. P.* — The pathology of experimental yellow fever in the *Macacus rhesus.* I. Gross pathology. II. Microscopic pathology. III. Comparison with the pathology of yellow fever in man. Amer. J. Path. IV(5).1928.
102. *Hudson, N. P., Philip, C. B.* and *Davis, G. E.* — Protection tests with serum of persons recovered from yellow fever in the Western Hemisphere and West Africa. Additional report. Amer. J. Trop. Med. IX(4).1929.
103. *Hudson, N. P., Bauer, J. H.* and *Philip, C. B.* — Protection tests with serum of persons recovered from yellow fever in the Western Hemisphere and West Africa. Amer. J. Trop. Med. IX(1).1929.
104. *Jakob, A., Fialho, A.,* e *Villela, E. L.* — Alterações do systema nervoso na febre amarella. Nota previa. Brasil Medico XLII(33).1928.
105. *Jungmann, P.* — Zur Klinik des Gelbfiebers. Ein Beitrag zur Pathologie der Leber. Klin. Woch. VIII(1).1929.
106. *Klotz, O.* and *Simpson, W.* — Jaundice and the liver lesions in West African yellow fever. Amer. J. Trop. Med. VII(5).1927.
107. *Klotz, O.* and *Simpson, W.* — The spleen in West African yellow fever. Amer. J. Path. III(5).1927.
108. *Klotz, O.* and *Belt, T. H.* — The identity of yellow fever lesions in Africa and America. Amer. J. Trop. Med. X(5).1930.
109. *Kuczynski, M. H.* — A propos de la note de Costa Cruz sur l'étiologie de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. CII(31).1929.
110. *Kuczynski, M. H.* and *Hohenadel, B.* — Untersuchungen zur Ätiologie und pathogenese des Gelbfiebers. Klinische Woch. VIII(1-2).1929.
111. *Kuczynski, M. H.* and *Hohenadel, B* — The aetiology of yellow fever. Lancet CCXVIII(5552).1930.
112. *Kuczynski, M. H., Hohenadel, B.* e *MacClure, Ed.* — Experiencias em antigas culturas do *Bacillus hepato-dystrophicans.* Klinische Woch. VIII(41).1929.

113. *Kuczynski, M. H., Hohenadel, B.* e *MacClure, Ed.* — A febre amarella em macacos americanos. Klinische Woch. VIII(42).1929.
114. *Kuczynski, M. H.* and *Hohemadel, B.* — Investigations into the etiology of yellow fever with special reference to the problem of insect-borne diseases. Trop. Med. & Hyg. XXIII(5).1930.
115. *Kuczynski, M. H.* — Recherches sur l'étiologie et la pathogénèse de la fièvre jaune. Presse Médicale XXXVII(29).1929.
116. *Lacorte, J. G.* e *Villela, G. G.* — O liquido cephalo-racheano na febre amarella. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (2).1928 et C. R. Soc. Biol. XCIX(34).1928.
117. *Lasnet, A.* — Compte rendu des cas de fièvre jaune observés en Afrique occidentale française du Juillet 1926 à Février 1927. Bull. Acad. Méd. XCVII(14).1927
118. *Lasnet, A.* — Note sur la fièvre jaune au Sénégal en 1927. Bull. Acad. Med. C (27).1928.
119. *Legendre, J.* — La fièvre jaune peut-elle s'étendre à tous les pays à Stegomyia? Presse Médicale XXXVII(28).1929.
120. *Leger, M.* — Etat actuel de nos connaissances sur l'épidémiologie de la fièvre jaune. J. Méd. de Bordeux CV(24).1928.
121. *Le Gac, P.* — L'excitation amarile. Bull. Soc. Path. Exotique XXII(8).1929.
122. *Lewis, Paul A.* — The survival of yellow fever virus in cultures. J. Exp. Med. LII(1).1930.
123. *Lins, S. L.* — Contribuição ao estudo clinico da febre amarella. Arch. de Hygiene III(1).1929.
124. *Lins, S. L.* — A febre amarella atravez um seculo de observação clinica e orientação scientifica. Confer. na Soc. Med. Cir. S. Paulo. Brasil Medico XLIV(9-10). 1930.
125. *Lintz, A.* e *Parreiras, D.* — Aspectos epidemiologicos e prophylacticos da campanha de febre amarella no Estado do Rio. Folha Medica X(23).1929.
126. *Marchoux, E.* — L'homme est moins sensible que le *Macacus rhesus* au virus de la fièvre jaune. C. R. Acad. Sc. CLXXXVII(4).1928.
127. *Marchoux, E.* — La fièvre jaune et la sensibilité du *Macacus rhesus*. Ann. Inst. Pasteur XLIII(6).1929.
128. *Mathis, C., Sellards, A. W.* & *Laigret, J.* — Sensibilité du *Macacus rhesus* au virus de la fièvre jaune. C. R. Acad. Sc. CLXXXVI(9).1928.
129. *Mello, A. da S.* — O problema da immunidade na febre amarella. Brasil Medico XLII(39).1928.
130. *Mello, A. da S.* — Questões de epidemiologia no actual surto de febre amarella. Brasil Medico XLII(41).1928 et XLII(48).1928.
131. *Meyer, J. R.* e *Castro, G. O.* — Inclusões nucleares acidophilas na febre amarella experimental. S. Paulo Medico III(1).1930.
132. *Moignic, Le* — Une conférence sur la fièvre jaune (Dakar, 23-28 avril 1928) Presse Médicale XXXVI(59).1928.
133. *Moncorvo, F.°* — Diagnostico differencial da febre amarella na infancia. Brasil Medico XLII(44).1928.
134. *Monteiro, J. Lemos* — Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de percevejos infectados. Nota preliminar. Communicação á Soc. Med. e Cir. de S. Paulo (Sessão 15-VIII-1929), Brasil Medico XLIII(35).1929 et Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo XIII(6 e 7).1929.
135. *Monteiro, J. Lemos* — Contribuição ao estudo da flora microbiana na febre amarella e suas relações immunologicas com a infecção humana e experimental. Sobre a possibilidade de um diagnostico bacteriologico da febre amarella. (Apresentado á 4.ª Conferencia Sul-Americana de Microb., Hyg. e Path. Rio, Julho 1929). Arch. de Hygiene III(2).1929.



136. *Monteiro, J. Lemos* — Notas e observações sobre a febre amarella experimental. (Trabalho apresentado á 4.ª Conferencia Sul-Americana de Microb., Hyg. e Path. Rio, VII-1929). Arch de Hygiene III(2).1929.
137. *Monteiro, J. Lemos* — Estudos sobre a febre amarella. Sobre a possibilidade de um diagnostico bacteriologico da febre amarella. Brasil Medico XLIII(19).1929.
138. *Monteiro, J. Lemos* — 1. Comportamento experimental do virus da febre amarella. 2. Resistencia do virus amarillico á acção de antisepticos sob certas condições. 3. Transmissão do virus amarillico pelas fezes de percevejos, *Cimex lectularius*, infectados. 4. Possibilidade da existencia de depositarios do virus amarillico entre os animaes domesticos. 5. Sobre uma nova technica para o preparo da vaccina amarillica. 6. Pesquisas de microorganismos no sangue de *Macacus rhesus* infectado com o virus amarillico. (Notas apresentadas á Soc. de Biologia de S. Paulo, sessão de 11-III-1930).
139. *Monteiro, J. Lemos* — A febre amarella á luz das modernas acquisições experimentaes (Communicação á Soc. de Med. e Cir. de S. Paulo, sessão de 2-V-1930).
140. *Monteiro, J. Lemos* — Virus amarillico neurotropico. Com. 6.ª reunião da Soc. Arg. Path. Reg. do Norte.
141. *Monteiro, J. Lemos* — Sobrevivencia do virus amarillico no organismo de certos animaes domesticos. Com. 6.ª reunião da Soc. Arg. Path. Reg. do Norte.
142. *Monteiro, J. Lemos* e *Travassos, J.* — Diagnostico sórologico da febre amarella. Sobre a reacção da fixação do complemento na febre amarella; seus resultados e valor pratico. Brasil Medico XLIV(11).1930.
143. *Moses, A.* — Reacções sòrologicos na febre amarella. Arch. de Hygiene III(1).1929.
144. *Nicolas, Ch.* — A propos d'une épidémie de dengue compliquée d'ictère. La dengue serait-elle une fièvre amarylle attenuée? Bull. Soc. Path. Exotique XXI(9).1928.
145. *Oliveira, W.* — Prophylaxia da febre amarella no Estado de S. Paulo, Brasil. Arch. de Hygiene III(2).1929.
146. *Otero, F.* — Fiebre amarilla. Su diagnostico differencial. La Semana Medica XXXVI (26).1929.
147. *Otero, F.* — Fiebre amarilla. Exposicion analitica de los sintomas en relacion con el diagnostico respectivo. La Semana Medica XXXVI(23).1929.
148. *Otero, F.* — Fiebre amarilla. Su anatomia patologica. La Semana Medica XXXVI (30).1929.
149. *Pani, M.* — Sobre a febre amarella no Mexico. Rev. Hyg. e Saúde Publica III (5).1929.
150. *Parreiras, D.* — Algumas observações sobre a vaccina amarillica de Aragão. Sciencia Medica VII(8).1929.
151. *Penido, J. C. N.* — Observações sobre alguns elementos da urina na febre amarella. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (2).1928.
152. *Penna, O.* e *Figueiredo, B. de* — Contribuição ao estudo da histo-pathologia do figado na febre amarella. Folha Medica X(20).1929.
153. *Penna, O.* e *Figueiredo, B. de* — Diagnostico histo-pathologico da febre amarella pelas lesões de Councilman. Brasil Medico XLIII(51).1929.
154. *Pereira, J. R.* — Etiologia e prophylaxia da febre amarella 70 annos atraz. Ann. Paul. Med. & Cirurgia XX(7).1929.
155. *Pettit, A.* — Virus de la fièvre jaune. Paris Médical XVIII(41).1928.
156. *Pettit, A.* et *Stefanopoulo, G.* — Absence d'anticorps pour les Spirochètes ictérogènes et voisins, dans le sang des sujets atteints de fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(22).1928.
157. *Pettit, A.* et *Stefanopoulo, G.* — Le virus de la fièvre jaune. Bull. Acad. Méd. C(32).1928.

158. *Pettit, A.* et *Stefanopoulo, G.* — Réceptivité de divers singes pour le virus amaril. C. R. Soc. Biol. CII(31).1929.

159. *Pettit, A.* et *Stefanopoulo, G.* — Infections expérimentales inapparentes provoquées par le virus amaril chez les singes réceptifs. C. R. Soc. Biol. CII(33).1929.

160. *Pettit, A., Stefanopoulo, G.* et *Aguessy, C.* — Le virus de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(22).1928.

161. *Pettit, A., Stefanopoulo, G.* et *Frasey, V.* — Pouvoirs préventif et curatif du sérum anti-amaryllique. C. R. Soc. Biol. XCIX(28).1928.

162. *Pettit, A., Stefanopoulo, G.* et *Frasey, V.* — Sérum anti-amaryllique. C. R. Soc. Biol. XCIX(25).1928.

163. *Pettit, A., Stefanopoulo, G.* et *Koloehine, C.* — Sur la réceptivité des singes au virus de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(22).1928.

164. *Pettit, A., Stefanopoulo, G. et Kolochine, C.* — Conservation du virus amaril. Bull. Acad. Méd. CII(29).1929.

165. *Pettit, A., Roubaud, E.* et *Stefanopoulo, G.* — Fièvre jaune des singes consecutive aux piqûres par Stegomias de Tunisie, de Java et Cuba. C. R. Soc. Biol. CIV (15).1930.

166. *Pichat, J.* — Note sur l'urine de sujets atteints de fièvre jaune. Bull. Acad. Méd. CI(12).1929.

167. *Philip, C. B.* — Possibility of hereditary transmission of yellow fever virus by *Aëdes aegypti*. J. Exp. Med. L(6).1929.

168. *Philip, C. B.* — Studies on transmission of experimental yellow fever by mosquitoes other than *Aëdes*. Amer. J. Trop. Med. X(1).1930.

169. *Ravina, A.* — L'etat actuel du problème étiologique de la fièvre jaune. Presse Médicale XXXVI(63).1928.

170. *Rezende, C.* — Febre amarella. Pontos controversos. Brasil Medico XLII(50).1928.

171. *Regendanz, R.* — Resumo dos resultados das pesquisas sobre a febre amarella. Rev. Med. Germano-ibero-americana (7).1929.

172. *Ribeiro, L.* — Une épidémie de fièvre jaune à Rio de Janeiro. Presse Médicale XXXVI(102).1928.

173. *Rocha Lima, H.* — O diagnostico post-mortal da febre amarella. Folha Medica IX (18).1928.

174. *Rocha Lima, H.* — Refutação do artigo de O. Penha e B. Figueiredo na "Folha Medica" sobre a contribuição brasileira para o conhecimento da pathologia da febre amarella. Sciencia Medica VII(9).1929.

175. *Roubaud, E.* — Recherches biologiques sur le moustique de la fièvre jaune, *Aëdes argenteus* Poiret. Facteurs d'inertie et influences réactivantes du developpement. Les oeufs durables et leur importance dans le rajeunissement du cycle évolutif. Ann. Inst. Pasteur XLIII(9).1929.

176. *Salles Gomes, L.* — Pesquisas em torno de alguns casos de febre amarella. Arch. de Hygiene III(2).1929.

177. *Santos, J.* — Notas em torno de alguns casos de febre amarella. Brasil Medico XLII(42).1928.

178. *Sautet, J.* — A propos de l'emploi des hypochlorites dans la lutte contre la fièvre jaune. Bull. Soc. Path. Exotique XXIII(2).1930.

179. *Sawyer, W. A., Lloyd, W. D. M.* and *Kitchen, S. F.* — The preservation of yellow fever virus. J. Exp. Med. L(1).1929.

180. *Sawyer, W. A.* and *Frobisher, M.* — The filtrability of yellow fever virus as existing in the mosquito. J. Exp. Med. L(6).1929.

181. *Sawyer, W. A., Kitchen, S. F., Frobisher, Jr., M.* and *Lloyd, W.* — The relationship of yellow fever of the Western hemisphere to that of Africa and to leptospiral jaundice. J. Exp. Med. LI(3).1930.
182. *Seidl, C.* — O surto de febre amarella no Rio de Janeiro. Rev. Med. Cir. do Brasil XXXVI.1928.
183. *Sellards, A. W.* — La lutte contre la fièvre jaune. Bull. Soc. Path. Exotique XXI (1).1928.
184. *Sellards, A. W.* — The cultivation of treponemata from the blood of normal monkeys (*Macacus rhesus*) and from blood of monkeys infected with yellow fever. Proc. Nat. Acad. Sc. XVI(3).1930.
185. *Sellards, A. W.* — Observations on yellow fever. Southern Med. J. XXIII(2).1930.
186. *Sellards, A. W.* and *Hindle, E.* — The preservation of yellow fever virus. Brit. Med. J. I.(3512).1928.
187. *Sellards* et *Laigret* — Sensibilité du *Macacus rhesus* au virus de la fièvre jaune. C. R. Acad. Sc. CLXXXVI(9).1928.
188. *Sellards, A. W.* — The cultivation of a Rickettsia-like micro-organism from tsutsugamushi disease. Amer. J. Trop. Med. III(6).1923.
189. *Snijders, E. P.* — Beitrag zur Klinik und pathologischen Anatomie des Gelbfieber. Archiv f.Schiffs Trop.-Hyg. XXXIII(3).1929.
190. *Sorel, E.* — La fièvre jaune chez les indigènes à Dakar en 1927. Bull. Soc. Path. Exotique XXI(7).1928.
191. *Stefanopoulo, G.* — Sur les rapports étiologiques de la dengue et de la fièvre jaune. Bull. Soc. Path. Exotique XXII(7).1929.
192. *Stokes, A., Bauer, J. H.* and *Hudson, N. P.* — Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. Amer. J. Trop. Med. VIII(2).1928.
193. *Stokes, A., Bauer, J. H.* and *Hudson, N. P.* — The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*: preliminary note. J. A. M. A. XC(4).1928.
194. *Sorel, F.* et *Armstrong* — Désinfection des immeubles de Dakar à la suite de l'épidemie de fièvre jaune de 1927. Bull. Soc. Path. Exotique XXI(9).1928.
195. *Theiler, M.* and *Sellards, A. W.* — The immunological relationship of yellow fever as it occurs in West Africa and in South America. Ann. Trop. Med. & Parasit. XXII(4).1928.
196. *Theiler, M.* — Susceptibility of white mice to the virus of yellow fever. Science LXXI(1840).1930.
197. *Theiler, M.* — Studies on the action of yellow fever virus in mice. Ann. Trop. Med. & Parasit. XXIV(2).1930.
198. *Toledo Piza, J.* — A campanha da febre amarella no Brasil. Brasil Medico XLII (34).1928.
199. *Torres, C. M.* — Sobre a "necrose salpicada" do figado na febre amarella. Sciencia Medica VI(8).1928.
200. *Torres, C. M.* — Sobre a degeneração oxychromatica da cellula hepatica como lesão caracteristica na infecção experimental pelo virus brasileiro da febre amarella. Brasil Medico XLII(36).1928.
201. *Torres, C. M.* — Sur l'importance de la dégénérescence oxychromatique des cellules du foie chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus brésilien de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(34).1928.
202. *Torres, C. M.* — Inclusions nucléaires acidophiles (dégénérescence oxychromatique) dans le foie du *Macacus rhesus* inoculé avec le virus brésilien de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(30).1928.
203. *Torres, C. M.* — Inclusions intranucléaires et nécrobiose chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(34).1928.

204. *Torres, C. M.* — Dégénérescence oxychromatique dans le foie de *Macacus rhesus* et *M. cynomolgus*, acompagnant les lésions typiques de la fièvre jaune experimentale; son absence dans le foie de singes non inoculés. C. R. Soc. Biol. XCIX (34).1928.
205. *Torres, C. M.* — Sur la dégénérescence oxychromatique du foie chez des singes inoculés avec le virus de fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(34).1928.
206. *Torres, C. M.* — Inclusões nucleares acidophilas (degeneração oxychromatica) na febre amarella experimental. Sciencia Medica VI(9).1928.
207. *Torres, C. M.* — Etude, par le procédé de Goodpastore et la réaction de Feulgen, des inclusions nucléares de la fièvre jaune experimentale. C. R. Soc. Biol. C(11). 1929.
208. *Torres, C. M.* — Sur les inclusions nucléaires dans la fièvre jaune expérimentale (virus brésilien et africain). C. R. Soc. Biol. CI(24).1929.
209. *Torres, C. M.* — Alterations nucléaires des cellules du foie chez les singes inoculés avec le virus brésilien et africain de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. CI (24).1929.
210. *Torres, C. M.* — Altérations du nucléole des cellules du foie dans la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. CII(28).1929.
211. *Torres, C. M.* — Morphologie des inclusions hepatiques dans la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. CII(29).1929.
212. *Torres, C. M.* — Intranuclear inclusions in experimental yellow fever. Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (6).1929.
213. *Torres, C. M.* et *Azevedo, A. P.* — Lésions des surrénales dans la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. XCIX(34).1928.
214. *Vellard, J.* — Modificações da coagulação sanguinea na febre amarella. Brasil Medico XLIII(21).1929.
215. *Vellard, J.* et *Vianna, M.* — Modifications de la coagulation du sangue dans la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. CI(24).1929.
216. *Vellard, J.* et *Vianna, M.* — Modifications de la coagulation sanguine dans la fièvre jaune; leur importance pour le diagnostic précoce. C. R. Acad. Sc. CLXXXVIII (22).1929.
217. *Vianna Jr., A.* — Considerações sobre a etiologia e prophylaxia da febre amarella. Brasil Medico XLII(21).1928.
218. *Vogel, W. de* — Les expériences de transmission de la fièvre jaune à l'Institut Colonial d'Amsterdam. Bull. Off. Intern. Hyg. Publ. XXII(2).1930.
219. *White, J. H.* — Epidemiologia da febre amarella. A Folha Medica IX.1928.
220. .... — Résultats de la conférence de la fièvre jaune à Dakar (23-IV à 1-V-1928). Bull. Off. Intern. Hyg. Publ. XX(6).1928.

Kelser, R. A. com a collaboração de *S. Youngberg* e *T. Topacio* — An improved vaccine for immunization against rinder-pest. J. Amer. Vet. Med. Assn. 27(1).1928.
Rodier, E. A. — A single injection method of immunization against rinder-pest J. Amer. Vet. Med. Assn. 27(1).1928.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, terminado em setembro de 1930).

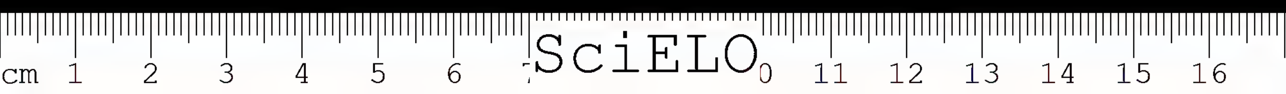
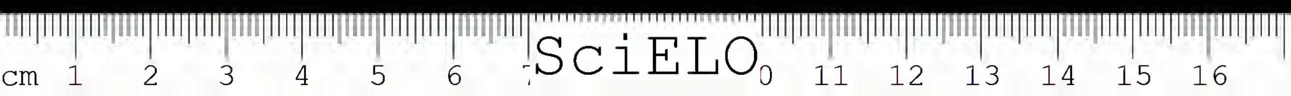




Fig. 1 - *Macacus rhesus normal*



Fig. 2 - *Macacus rhesus* N.º 1, no ultimo periodo de febre amarella experimental


SciELO

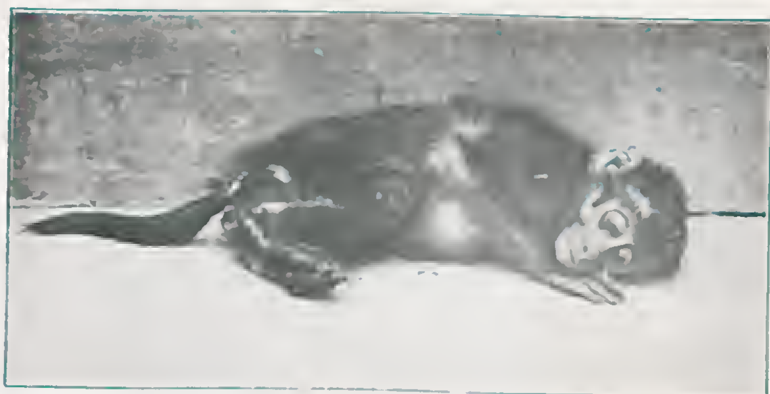


Fig. 3 - *Macacus rhesus* N.° 8, prestes a morrer de febre amarella experimental



Fig. 4 - *Macacus rhesus* N.° 6, em periodo de adynamia na febre amarella experimental

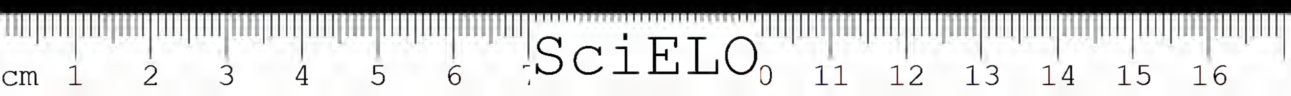
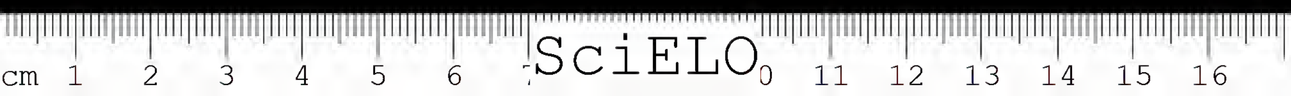

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16



Fig. 5 - *Macacus rhesus* N.º 9, em periodo de adynamia na febre amarella experimental



Fig. 6 - *Macacus rhesus* N.º 44, em periodo de adynamia na febre amarella experimental


SciELO

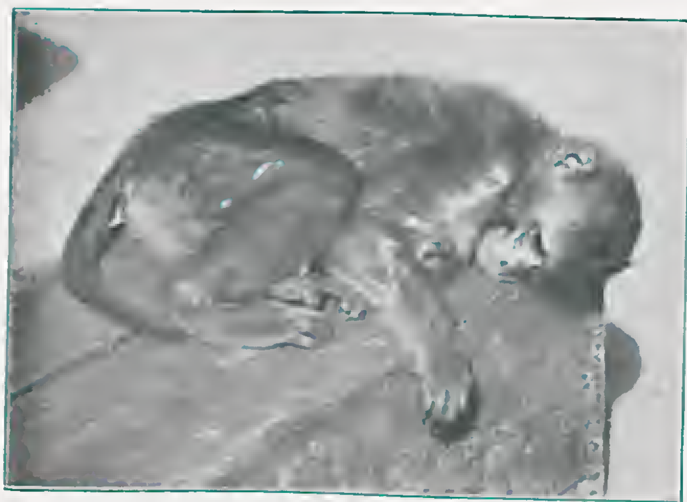


Fig. 7 - *Macacus rhesus* N.° 44, prestes a morrer de febre amarella experimental

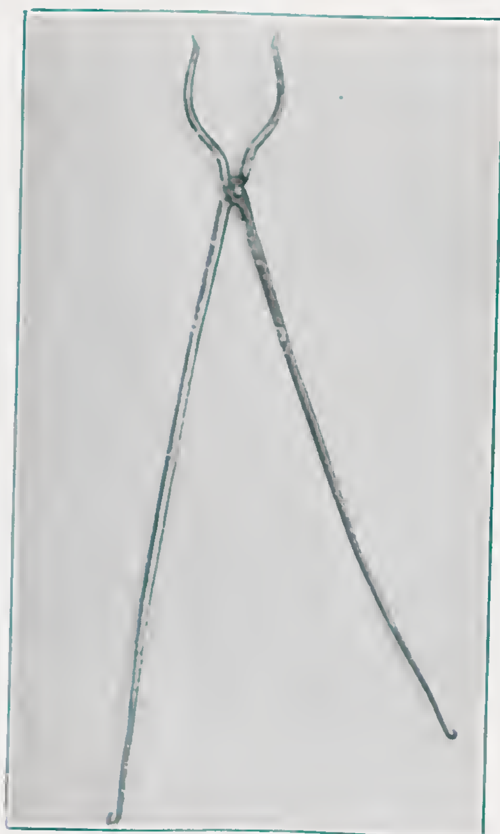
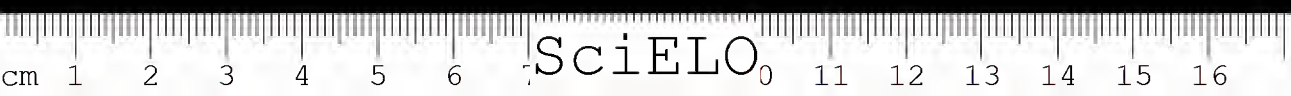


Fig. 8 - Pinça para prehensão de macacos


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

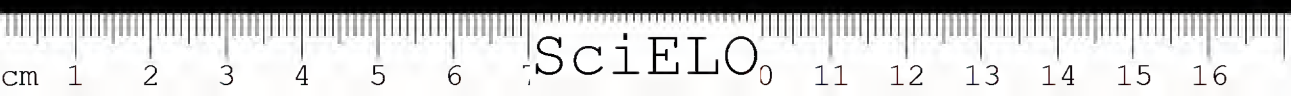
Mem. Inst. Butantan
Vol. V. 1930



Fig. 9 - Camondongo N.° 2, na phase paralytica da infecção pelo virus amarillico neurotropico



Fig. 10 - Camondongo N.° 3, na phase paralytica da infecção pelo virus amarillico neurotropico


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16

DIAGNOSTICO SOROLOGICO DA FEBRE AMARELLA

SOBRE A REACÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

POR

J. LEMOS MONTEIRO E J. TRAVASSOS


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

auxilios em periodo mais adeantado da doença e para a verificação de convalescentes.

A prova da infectuosidade do sangue do doente em relação ao *Macacus rhesus*, embora de resultados tardios e dispendiosa, deve ser executada, sempre que for possivel, mormente nos primeiros casos do apparecimento do mal, pois, dentre as demais, quando positiva, é a unica fiel.

Se o desfecho clinico é a morte, a histologia pathologica confirma ou infirma o diagnostico, com a verificação do conjuncto de lesões que se convencionou chamar de signal de Rocha Lima. Na convalescença ou depois da cura clinica do doente, só se poderão colher elementos para o diagnostico com os methodos que visam a pesquisa dos anticorpos no sangue ou com a prova do poder protector do sôro. Infelizmente, esta ultima, para ser prova fiel, necessita não só de um virus sufficientemente activo para o *rhesus*, como de ser realizada em varios animaes e respectivas testemunhas, o que a torna dispendiosa (*).

As provas baseadas na pesquisa dos anticorpos, alem de serem especificas e facilmente realizaveis, reduziriam a questão a uma simples manipulação de laboratorio, com grandes vantagens e real proveito pratico.

Essas vantagens praticas, alem de outras, como seja a acquisição de mais uma prova para a verificação da identidade dos virus africano e americano, já demonstrada por Theiler, Sellards e Watson, Hudson, Bauer e Philip, por Aragão e por um de nós, justificariam a tentativa de novas pesquisas experimentaes em torno do assumpto.

O poder protector do sôro de convalescentes de febre amarella, já assignalado por Marchoux, Salimbeni e Simond em o seu trabalho de 1903, provado experimentalmente por Hudson, Bauer e Philip e entre nós por Aragão, mostrava-nos que não seria impossivel a pesquisa de anticorpos nesses sôros, mesmo usados os methodos de que actualmente dispomos para essa ordem de investigacões. A pesquisa que realizámos, de agglutininas não especificas, para certo *Corynebacterium*, abriu-nos o caminho e falou desde logo a favor dessa possibilidade. Por isso é que, numa outra ordem de estudos, nos propusemos a pesquisar os anticorpos especificos fixadores do complemento nos sôros de doentes, convalescentes e de individuos clinicamente curados do mal e ainda nos sôros dos *M. rhesus* inoculados com o virus amarillico, afim de verificar se colheriamos dados que pudessem ser uteis. A maior difficuldade a resolver estava no preparo do antigeno a usar na reacção. Sabendo-se com segurança que o virus

(*) Na segunda parte deste trabalho (2.ª nota), discutimos o valor desta prova, em virtude dos resultados obtidos com soros de individuos naturalmente (?) immunizados (residentes em zonas endemicas do mal) e possuidores de anti-corpos fixadores do complemento.

se encontra principalmente no figado, este orgam deveria ser o escolhido para o preparo do antigeno.

Em pesquisas preliminares empregamos os antigenos salinos phenolados, formolados e chloroformados, usados nos solutos vaccinantes, sem que obtivessemos qualquer resultado animador, o que vem confirmar as verificações de Aragão e outros. Usámos, de identico modo, o sangue do macaco infectado, colhido em franca reacção febril, com os mesmos resultados. Passámos aos coctoantigenos, ultimamente aconselhados por Moses, preparados conforme a technica descripta por Krause e Takaki, mas, a despeito de termos obtido fixações ligeiras com os sôros especificos, os resultados finaes não foram apreciaveis.

Tratando-se de uma doença de agente etiologico desconhecido, que se inclue na classe dos virus filtraveis, procurámos entre as suas similares uma em que a prova da fixação do complemento tivesse dado melhores resultados para termos, assim, elementos de orientação em nossos estudos preliminares. No particular, chamaram-nos a attenção as pesquisas de Ciuca, na febre aphtosa, demonstrando que um bom antigeno era conseguido pela maceração septica do epithelio das vesiculas, cujo poder altamente infectuoso já tinha sido provado pelas pesquisas de Vallée, Carré e Rinjard. Por tal processo tratava-se de obter as substancias advindas da desintegração cellular por um processo de autolyse e, talvez mesmo, uma modificação do estado colloidal das proteinas que, segundo Ciuca, offereceriam desta maneira menor embaraço á reacção de fixação do complemento do que quando em suas primitivas condições. Essas vantagens, no entanto, a nosso ver, eram algo embaraçadas pela presença e cultivo de germes de nenhuma relação com o mal e cuja actividade biologica seria aproveitada na desintegração tissular, indo formar antigenos outros, que agiriam sob a influencia de determinados sôros e em condições especiaes. Obteriamos, desse modo, antigenos collateraes de que nos fallam Schultz, Bullock e Lawrence.

As investigações de Hindle (2), mostrando que se póde obter uma maior quantidade de virus dos figados de animaes infectados provocando-se o rompimento cellular por differença de pressão osmotica, deu-nos orientação para a technica do preparo de um antigeno, que teria provavelmente as qualidades essenciaes do de Ciuca, com a vantagem de reduzir as affinidades collateraes. A desintegração cellular, realizada assim por um processo physico-chimico, permittiria obter em solução o contéudo cellular e com elle a substancia antigenica.

Frobisher Jor., com orientação identica, conseguira já resultados animadores.

Technica para o preparo do antigeno

Para o preparo do antigeno procedemos do seguinte modo: figado de *Macacus rhesus* infectado pelo virus africano (amostra da raça Asibi), colhido por occasião da necropsia realizada logo após a queda da temperatura e sacrificio do animal, é pesado, cortado em pequenas fatias de 2 a 3 millimetros de espessura e lavado em agua physiologica renovada por varias vezes. A ultima porção

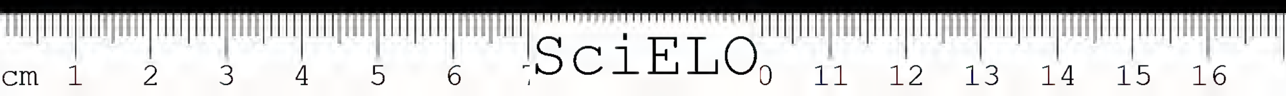
da agua de lavagem é decantada e os fragmentos do orgam são collocados em um almofariz e triturados com areia esteril. Para cada gramma de figado addiciona-se 1 cc. de uma solução esterilizada hypertonica e de titulo conhecido de chloreto de sodio (usamos a 10 %); mistura-se bem e deixa-se 24 horas no *frigo* em um frasco com rolha de esmeril, esterilizado e contendo perolas de vidro. Junta-se, então, agua destillada esterilizada em quantidade tal, que reduza a 8,5 por mil a concentração final do chloreto de sodio no soluto salino empregado. Junta-se a quantidade de agua á emulsão de figado rapidamente e agita-se o frasco o mais energicamente possivel por espaço de 1 hora. Centrifuga-se ou filtra-se em papel e depois em vela Mandler, de 14 libras de pressão. O filtrado, que guarda uma côr amarellada, é distribuido asepticamente em empolas estereis, e, semeado em meios aerobios e anaerobios, deve mostrar-se completamente desprovido de germes, constituindo o antigeno, que é conservado no *frigo*.

Ensaios preliminares

Procurando verificar a acção anti-complementar desse antigeno, observámos que elle é totalmente desprovido dessa propriedade desde a dose de 0,5 cc., em face de 2 unidades complementares. Nessa mesma quantidade é desprovido de acção hemolytica, isoladamente ou em face de um sôro.

Em um primeiro ensaio experimentámos o antigeno assim preparado na dose de 0,2 cc. com um sôro de convalescente de febre amarella, com um de um *rhesus* que resistiu á infecção e um outro humano, de individuo normal e que sempre residiu em zona indemne do mal. Em face de 2 unidades complementares, os 2 primeiros sôros ensaiados fixaram o complemento; o do individuo normal, immediatamente após a hemolyse do testemunha do sôro, mostrou uma fixação ligeira e 3 minutos após já estava totalmente hemolysado. Esse primeiro ensaio estimulou-nos a proseguir nas pesquisas, pelo que desde logo procurámos estabelecer a unidade antigenica. Para isso, ensaiámos com o sôro de P. F. N., convalescente de febre amarella, cujo resultado anterior fora perfeitamente satisfactorio: verificámos que 0,05 cc. era a dóse minima de antigeno necessaria para que, em face de 2 unidades complementares, houvesse completa fixação do complemento, a leitura sendo feita 10 minutos após o apparecimento de hemolyse total no testemunha do sôro.

Procurando, em seguida, outras propriedades desse mesmo sôro em face do antigeno, notámos o phenomeno da precipitação, sómente no tubo em que os dois elementos se encontravam em partes iguaes, emquanto que nos demais, com dóses menores de antigeno, nada observámos. Com o sôro normal, testemunha, conservados os elementos na mesma quantidade, nenhum precipitado foi verificado, mostrando-se o liquido perfeitamente claro. Esses ensaios levaram-nos a usar em nossos estudos o sôro a examinar e o antigeno, em partes eguaes.



Outros elementos da reacção

Os varios outros elementos constantes da reacção foram assim preparados:

Sôro a examinar - Os primeiros sôros que examinámos, de doentes e *rhesus* infectados pelo virus africano, vinham sendo conservados em empolas e no *frigo*; muitos delles mesmo aquecidos a 55° mostraram-se anti-complementares. Os demais sôros, colhidos quando já estavamos em trabalho sobre o assumpto e quando não eram utilizados logo no dia immediato, soffriam um aquecimento previo de 15 minutos a 55°. No dia em que praticavamos as reacções, todos os sôros eram aquecidos. Em alguns desses sôros notamos uma hemolyse rapida, já perfeitamente visivel em 10-15 minutos. Em outros, ao contrario, era tardia, indo até 30 minutos e mais. Essas differenças devem correr por conta das hemolysinas naturaes anti-carneiro que aquelles podem conter. Pensamos, entretanto, que ellas não exercem grande influencia na reacção propriamente dita, pois em alguns sôros, cujo testemunha hemolysava rapidamente com uma e duas unidades complementares, tivemos resultados francos de fixação, usando tres e mesmo quatro unidades complementares. A quantidade de sôro usada nas reacções foi a de 0,2 cc.

Complemento - Tres cobaias (machos) eram sangradas na tarde da vespera. Coagulado o sangue, separava-se o sôro, centrifugava-se e guardava-se no *frigo* até a manhã seguinte, quando era dosado. A dosagem do complemento é assumpto capital nas reacções de fixação. Já é da pratica corrente fazer-se a dosagem em face do antigeno em dóse identica á que se vae usar na reacção. Aconteceu, porem, que o nosso antigeno accelerava a acção da alexina e, de outro lado, contribuia para a formação de um complexo que fixava ligeiramente o complemento, quando em presença de um sôro negativo. Dahi a necessidade de se dosar o complemento em face do antigeno e de um sôro negativo, escolhendo-se de preferencia os de extrangeiros, recentemente chegados ao paiz. Entre esses se seleccionam os que, por si sós, não accelerem demasiadamente o phenomeno da hemolyse. Usámos como unidade complementar a menor quantidade de complemento necessaria para se obter a hemolyse completa dos globulos em meia hora, em face de um sôro negativo, do antigeno e de 3 a 4 unidades hemolyticas.

Systema hemolytico - A hemolysina empregada foi a de coelho anti-carneiro, usada na dóse de tres a quatro unidades hemolyticas. Os globulos de carneiro eram lavados varias vezes e diluidos a 5 %.

Technica da reacção

Sabida que é a possivel fallibilidade deste methodo sorologico nas doenças infectuosas e dada a difficuldade de sua realização em virtude da serie de elementos de maior ou menor variabilidade, com que o pesquisador tem de lidar, somente depois de estabelecida a uniformidade da technica se poderiam colher ensinamentos uteis ao diagnostico. Foi o que procuramos fazer, adoptando, após varios ensaios,

a technica que passamos a expôr, por ser, não só a mais adaptavel ás condições do material com que iniciámos as nossas pesquisas (sôros velhos, conservados no *frigo*), como tambem constante em os seus resultados. E' superponivel á technica de McIntosh Fields para os sôros anti-complementares e basea-se nos mesmos principios do methodo de Browning e McKenzie, Calmette e Massol, etc.

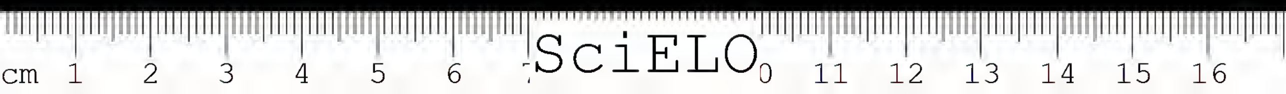
Entre os inconvenientes dessa technica contam-se o uso de maior quantidade de sôro e de complemento, e ainda a difficuldade na leitura quando se trabalha com muitos sôros a um só tempo. No nosso caso, porém, estas desvantagens tornam-se nullas, por isso que as duas primeiras são perfeitamente sanaveis, o mesmo acontecendo quanto á difficuldade na leitura, pois poucas seriam as vezes em que teriamos de examinar muitos sôros a um só tempo. Por outro lado, as vantagens que nos poderiam advir de seu caracter estrictamente quantitativo e da possibilidade de examinar sôros providos de propriedades anti-complementares, como era o nosso caso, superavam os obstaculos por ventura esperados. Eis porque a adoptamos.

A technica consiste no seguinte: a uma mesma quantidade de sôro a examinar (0,2 cc.) e de antigeno (0,2 cc.), addicionam-se quantidades crescentes de complemento, avaliadas por unidades e completa-se o volume para 1,5 cc. com agua physiologica, pondo-se os tubos em banho maria a 37°-38° durante 1 ½ hora. A cada tubo da reacção deve corresponder um testemunha do sôro, com identica quantidade de unidades complementares. O tempo de incubação da primeira phase tem uma certa importancia no resultado final da reacção. As nossas observações demonstraram que elle deve ser de 1 ½ - 2 horas a 37°, de 3 a 4 horas á temperatura ambiente e de uma noite a 10° (na geladeira).

As hematias, sensibilizadas com 3 a 4 unidades hemolyticas, são addicionadas, na segunda phase da reacção, num volume de 1 cc., seguindo-se nova incubação. Concomitantemente fazem-se tubos testemunhas com sôros seguramente negativos e positivos, obedecendo o mesmo criterio de numero crescente de unidades complementares.

A leitura immediata da reacção deverá fazer-se 10 minutos depois que os testemunhas preparados com os sôros negativos apresentarem hemolyse completa. Os testemunhas dos sôros a examinar (sem antigeno), orientarão o technico sobre a capacidade anti-complementar do sôro e sobre a possibilidade de poder ou não ser realizada a leitura no tempo indicado acima, devendo, de accordo com a marcha da reacção, ser prolongado o periodo de incubação. De qualquer modo, deve fazer-se uma leitura tardia, isto é, 24 horas depois e quando os tubos são conservados na geladeira.

Para a avaliação da intensidade da reacção, tomamos como norma o comportamento do segundo tubo em deante, isto é, o resultado de 2, 3, 4 e 5 unidades complementares, no caso de o sôro não mostrar impedimento. Nos sôros anti-complementares, o resultado nos é dado por differença do grau de hemolyse e só deverão ser tomadas em consideração as grandes differenças, entre os tubos teste-



munhas do sôro e da reacção propriamente dita, sendo a leitura feita após meia hora de incubação.

O eschema seguinte, figurada a hypothese de a unidade complementar ser 0,3 cc., dará uma idéa da reacção:

TUBO	Sôro a examinar	Antigeno	Complemento diluido: Unidades complementares	Complemento diluido: Quantidade	Salina a 8,5 0/00	1 1/2 a 2 horas em banho maria a 37°-38°	Globulos a 5 0/0 sensibilizados com 3 a 4 unidades hemolyticas	Incubação segundo comportamento dos testemunhas
Tubo reacção .	0.2	0.2	1	0.3	0.8		1 cc.	
Test. sôro . .	0.2	—		0.3	1.0		1 cc.	
Tubo reacção .	0.2	0.2	2	0.6	0.5		1 cc.	
Test. sôro . .	0.2	—		0.6	0.7		1 cc.	
Tubo reacção .	0.2	0.2	3	0.9	0.2		1 cc.	
Test. sôro . .	0.2	—		0.9	0.4		1 cc.	
Tubo reacção .	0.2	0.2	4	1.2	—		1 cc.	
Test. sôro . .	0.2	—		1.2	0.1		1 cc.	
	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.		etc.	

Uma serie identica será feita para os testemunhas, positivo e negativo, da reacção. Para o primeiro, poderá ser empregado um sôro de convalescentes de febre amarella ou de um *rhesus* immunizado; para o segundo, devem ser preferidos os de extrangeiros recentemente chegados ao paiz.

Resultados experimentaes

Praticamos a reacção com sôros de doentes e convalescentes de febre amarella, de *Macacus rhesus* infectados e immunizados, de doentes de outras infecções, de individuos normaes, residentes ou não em zonas onde a febre amarella tem existido e, finalmente, com sôros de extrangeiros recentemente chegados ao paiz.

O quadro abaixo resume os resultados e percentagens até agora obtidos:

Sôros de	Resultados		Observações
	Positivos	Negativos	
Casos de febre amarella e convalescentes	81,8	18,1	O n.º de sôros examinados foi reduzido (11). Outros se mostram anti-complementares.
Rhesus infectados e immunizados	95,8	4,1	Nos rhesus infectados a reacção mostra-se positiva desde o quarto dia.
Doentes de outras infecções .	14,5	85,4	Febre typhoide (com Widal positivo); doentes febris (com Widal negativo); typho exanthematico (Weil-Felix positivo) e syphilis (Wassermann positivo).
Nacionaes normaes residentes ou não em zonas onde tem havido febre amarella (*)	28,9	71,0	Residentes em S. Paulo, alguns tendo vivido no norte do paiz; de pessoas residentes na Bahia.
Extrangeiros recem-chegados ao paiz	0	100	Lithuanos e japoneses chegados em Santos na vespera da colheita do sangue.

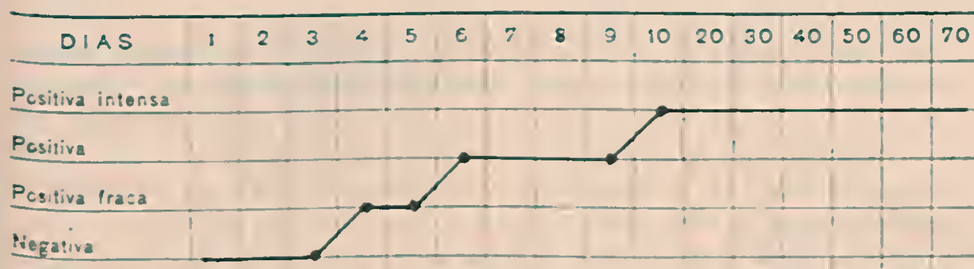
A simples vista do quadro acima dá-nos uma idéa da especificidade e sensibilidade da reacção e da possibilidade das indicações que poderá fornecer.

Quando iniciámos os nossos estudos sobre a fixação do complemento na febre amarella, já declinava francamente o surto epidemico verificado na capital do paiz e, por isto, poucos foram os sôros conseguidos para a nossa reacção. Os que tinham sidos guardados no *frigo*, mostravam-se na maioria anticomplementares, motivo por que 9 desses sôros foram inutilizados. Como não pudemos dispor de sôros colhidos em dias seguidos durante a evolução do mal, não conseguimos determinar em relação á infecção humana, desde quando a reacção começa a mostrar-se positiva. A quasi totalidade de sôros de amarellentos, por nós examinados, provinha de convalescentes e nos havia sido fornecida pelo dr. H Aragão.

No que diz respeito á febre amarella experimental, tivemos opportunidade de examinar sôros de 25 *rhesus*, tendo sido possivel acompanhar a evolução da reacção. Somente após o 4.º dia é que se puderam obter fixações do complemento, de pequena intensidade, augmentando gradativamente no 6.º e no 10.º dia.

(*) Para o estudo destes sôros, muito devemos á gentileza do Dr. Eduardo Araujo, director do Instit. Oswaldo Cruz da Bahia, que nos enviou 100 sôros de pessoas residentes em Salvador. Neste numero estão incluidos sôros de extrangeiros, geralmente portugueses, porém residentes ha annos na capital bahiana. Não foram ainda todos estudados, o que está sendo feito, de modo que a estatistica publicada poderá ser alterada em futuras publicações. Sôros de nacionaes residentes em zona indemne, colhidos de pessoas que nunca sahiram de S. Paulo, foram todos negativos.

O graphico abaixo dá uma idéa da marcha da reacção na infecção experimental.



Nos doentes de outras infecções, cuja percentagem de resultados positivos se elevou a 14,5 devemos levar em conta que se tratava, na maioria, de nacionaes. Com effeito, é possivel que alguns nacionaes cujo sôro foi ensaiado, apresentassem relativa immunidade pelo facto de talvez terem residido em antigos focos da infecção. Isto é tanto mais verdade quanto ficou apurado que, entre as pessoas ainda residentes em zonas endemicas, a percentagem de positivos se elevou a quasi 30 %.

De 20 sôros de extrangeiros examinados, lithuanos e japoneses, recemchegados ao paiz (24 horas antes), não obtivemos nenhum resultado positivo.

Frobisher Jor. (3), trabalhando sob os auspicios da Fundação Rockefeller de New York e baseado, como nós, na observação de Hindle, preparou o seu antigeno salino, provocando, pela differença de pressão osmotica, a ruptura das cellulas hepaticas contendo o virus. Os seus resultados concordam com os que obtivémos.

Pelos resultados acima descriptos, verifica-se que a reacção apresenta especificidade em relação á febre amarella humana e experimental, mostrando tambem a identidade dos virus africano e americano. Ella poderá servir igualmente para a verificação da immunidade de pessôas, principalmente nacionaes, residentes em zonas onde o mal tenha existido.

Para maior facilidade de preparação do antigeno pelos laboratorios não especializados, pensamos que poderia ser utilizado o material secco e conservado no vacuo e no *frigo*.

As nossas experiencias realizadas com antigeno salino de figado secco, preparado sob a mesma technica descripta acima, demonstram essa possibilidade, se bem que os resultados sejam muito inferiores.

SEGUNDA NOTA

Na nota anterior, que já havia sido publicada (1), mostrámos a possibilidade da pesquisa de anticorpos fixadores do complemento, na febre amarella humana e na experimental do *Macacus rhesus*. Para isso se faz mister o uso de um antigeno salino adequado, cujo preparo é baseado nas observações de Hindle (2), que demonstrou que se póde obter uma maior quantidade de virus dos figados de animaes infectados provocando-se o rompimento cellular por differença de pressão osmotica.

Esse antigeno mostra-se desprovido de acção anti-complementar desde a dóse de 0,5 cc. em presença de 2 unidades complementares, bem como de acção hemolytica, isoladamente ou em face de um sôro. Como tivessemos trabalhado com sôros antigos, conservados em empolas no *frigo*, mostrando-se muitos delles com elevado poder anti-complementar, fomos obrigados a usar uma technica (a de McIntosh Fields) que nos permittiu fazer as leituras com segurança.

Os resultados das reacções effectuadas até então, com sôros diversos, foram dados em resumo na nota anterior e concordavam com os de Frobisher Jor. (3) que os expoz em um trabalho publicado antes do nosso.

Agora daremos os resultados dos ensaios que realizámos posteriormente. Além de pequenas modificações de technica, tivemos a opportunidade de estudar mais alguns sôros de individuos que tiveram febre amarella no ultimo surto epidemico do Rio de Janeiro, e de proceder um maior numero de verificações, seja no decurso da infecção experimental do *Macacus rhesus*, seja em sôros de nacionaes residentes em localidades como a Bahia, onde a febre amarella parece existir endemicamente. Emfim, effectuámos algumas provas de protecção do *rhesus* com sôros que nos deram resultados positivos, conforme exporemos em seguida.

Novas verificações sobre o preparo do antigeno

São as seguintes as observações realizadas:

a) Segundo fez Frobisher Jor., pode-se empregar uma solução hypertonica de chloreto de sodio a 8,5 %, o que tem a vantagem de facilitar o calculo;

b) As nossas experiencias demonstraram que não ha maior vantagem em filtrar o antigeno em vela, mas sim em passal-o simplesmente em papel filtro juntando-lhe phenol e guardando-o no *frigo*: assim elle se conserva bem, mostra-se mais activo, permittindo a obtenção de resultados muito nitidos, o que deve correr por conta de uma maior riqueza em virus;

c) Na escolha do material para o preparo do antigeno, deve-se dar preferencia a figados (de *rhesus*) que se mostrem mais attingidos, com a côr camurça disseminada por todo o orgão, convindo sacrificar-se o animal logo após a quéda da temperatura e retirar do coração a maior quantidade possivel de sangue para que o figado fique bastante exsangue;

d) Os antigenos preparados com figados seccos, conservados no vacuo e no *frigo*, são muito menos activos;

e) As tentativas que realizámos de extracção da substancia antigenica pelo alcool, ether, etc., têm a desvantagem de imprimir ao antigeno a propriedade polytropica, apresentando, concomitantemente, affinidades para os anticorpos lipoidophilos dos sôros dos syphiliticos.

Technica da reacção

Como nesta nova serie tivessemos empregado sôros mais recentes, empregámos a technica geralmente usada nessa ordem de pesquisa, isto é, quantidades fixas de antigeno (0,2) e de complemento, em face de dóses decrescentes de sôro a estudar (0,2 - 0,1 - 0,05 cc.). O complemento, previamente dosado na manhã do dia em que praticavamos as reacções, em presença do antigeno, era usado na dóse correspondente a 2 unidades complementares.

Os sôros a pesquisar soffriam um previo aquecimento a 55° antes de serem utilizados na reacção. Para testemunhar o poder anti-complementar do sôro, usámos a dóse de 0,4 cc.. A hemolysina era empregada na dóse de 3 a 4 unidades e as hematias de carneiro, em suspensão a 5 %. Volume total de 2,5 cc.. A 1.ª incubação durava 1 1/2 a 2 horas e a segunda, apenas 1/2 hora. Fizemos sempre uma leitura immediata e uma outra após uma noite na geleira, de sorte que os resultados expostos neste trabalho são baseados sempre na ultima leitura.

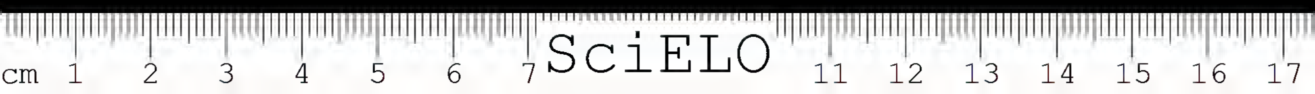
Os sôros que se mostraram anti-complementares foram posteriormente ensaiados segundo a technica que expusémos em nossa 1.ª nota.

Damos a seguir os resultados obtidos com sôros diversos, empregando um antigeno preparado com as modificações acima. Por elles se poderá ter idéa do valor pratico do methodo e, para que isto melhor se evidencie, os sôros são separados em differentes grupos, de accordo com sua procedencia.

Resultados obtidos na febre amarella humana

Conforme assignalámos no 1.° trabalho, quando iniciámos os nossos estudos sobre a fixação do complemento na febre amarella já declinava francamente o surto epidemico verificado na Capital do paiz e, por isto, poucos foram os sôros que conseguimos estudar. Os que tinham sido guardados no *frigo*, quasi todos em diminuta quantidade, mostraram-se, na maioria, francamente anti-complementares, motivo por que 9 dentre elles foram regeitados.

Como não conseguimos soros colhidos em dias seguidos durante a evolução do mal, não poude ser determinado, em relação á infecção humana, o periodo em que a reacção começa a apresentar resultados positivos nos casos confirmados



da molestia. A quasi totalidade dos sôros examinados provinha de convalescentes e de pessoas immunes; as amostras do 1.° grupo foram-nos enviadas pelo Dr. Henrique Aragão, do Instituto Oswaldo Cruz e as do 2.° foram colhidas por pessôa indicada pelo Dr. J. Barros Barreto, do Departamento Nacional de Saúde Publica. A estes distinctos collegas apresentamos aqui nossos agradecimentos.

O quadro abaixo resume os resultados obtidos:

Sôros de	Negativos	Positivos fracos	Positivos fortes	
Suspeitos, diagnostico não confirmado	3	0	1	No de resultado positivo, a necroscopia revelou impaludismo.
Febre amarella diagnostico clinico	1	2	0	
Convalescentes	0	1	4	
Após 4 a 20 mezes da infecção	1	3	11	

Resultados na febre amarella experimental do *Macacus rhesus*

Em nosso trabalho anterior demos os resultados obtidos na febre amarella experimental, segundo estudo feito em 25 *rhesus* no periodo de infecção e já immunizados. Verificámos que os anticorpos fixadores do complemento se mostram em maior quantidade do 10.° dia após a inoculação do virus, perdurando posteriormente pelo menos até o 70.° dia (periodo da pesquisa).

Nesta nova serie de ensaios tivemos a opportunidade de realizar maior numero de verificações, estudando sôros de *rhesus* em varias phases da evolução da doença e de *rhesus* immunizados, datando de mais de 12 mezes a infecção de alguns.

O quadro abaixo resume os resultados até agora obtidos:

Macacus rhesus	Total	Negativos	%	Positivos fracos	%	Positivos fortes	%
Normaes.	3	3	100	0	0	0	0
Após 3 a 5 dias. . . .	12	7	58,3	5	41,6	0	0
Após 6 a 9 dias. . . .	8	3	37.5	4	50,0	1	12.5
Após 10 a 30 dias . . .	26	0	0	3	11.5	23	88.4
Após 31 a 70 dias . . .	5	0	0	0	0	5	100.0
Mais de 1 anno	11	2	18.1	5	45,4	4	36,3

Positivos fracos: reacção + e ++
Positivos fortes: reacção +++ e ++++

Ainda por estes resultados se verifica que, na infecção experimental, a reacção se póde mostrar positiva desde o 4.° dia após a inoculação do virus. Tudo faz crer que os anticorpos fixadores do complemento augmentam, até um certo limite, no organismo do animal, permanecendo, na convalescença e nos immunizados, por largo espaço de tempo e provavelmente decrescendo em seguida.

Do 10.° dia em deante os anticorpos fixadores do complemento já são em grande numero, mas depois de 1 anno parece que vão desapparecendo, apresentando alguns animaes reacções negativas ou fracamente positivas.

Resultados com sôros de pessoas residentes na Bahia

Para o estudo da reacção em material proveniente de individuos normaes, de logares onde a febre amarella tem existido mais ou menos endemicamente, obtivemos por especial gentileza do director do Instituto Oswaldo Cruz da Bahia, Dr. Eduardo Araujo, a quem somos muito gratos pelo auxilio prestado, varios sôros de pessoas residentes em Salvador, capital daquelle Estado.

Em nossa primeira nota apresentámos os resultados percentuaes de alguns (20) desses sôros já examinados por aquella occasião. Agóra damos um estudo completo desses sôros, num total de 67:

Negativos	%	Positivos fracos	%	Positivos fortes	%
34	50,7	13	19,4	20	29,8

Por idade foram os seguintes os resultados percentuaes:

IDADES	Negativos	%	Positivos fracos	%	Positivos fortes	%
De 12 a 20 annos. .	8	11,9	1	1,5	2	3,0
De 21 a 30 annos. .	15	22,4	8	11,9	10	14,9
De 31 a 70 annos. .	11	16,4	4	6,0	8	11,9

De accordo com o sexo, os resultados foram os seguintes:

SEXO	Negativos	%	Positivos fracos	%	Positivos fortes	%
Masculino.	18	26,8	5	7,5	11	16,4
Feminino	16	23,9	8	11,9	9	13,4

Resultados com sôros de pessoas residentes em São Paulo

Do Instituto Bacteriologico obtivemos varios sôros de individuos aqui residentes e remettidos áquelle estabelecimento para nelles ser praticada a reacção de Wassermann, cujos resultados nos foram juntamente enviados. Procedémos a reacção de fixação do complemento com antigeno amarillico nesses sôros e

ainda em muitos outros que conseguimos de pessoas que habitam São Paulo h muitos annos, tendo, entretanto, algumas dellas passado temporadas no Rio d Janeiro. Não pudemos fazer um inquerito satisfactorio de todos, motivo por qu damos aqui somente os resultados obtidos:

SOROS	Negativos	%	Positivos fracos	%	Positivos fortes	%
Soros c Wassermann ++++ .	7	87.5	1	12,5	0	0
Soros c/ Wassermann negativo .	16	80,0	3	15,0	1	5,0
Diversos	19	79,1	3	12.5	2	8,3
Média	42	82.2	7	13,3	3	4.5

Resultados com sôros de extrangeiros recem-chegados ao paiz

De 20 sôros extrangeiros examinados, lithuanos e japoneses, recemchegado ao paiz (24 horas antes), não obtivemos nenhum resultado positivo.

Resultados com sôros de outras infecções

Com o intuito de estudar a especificidade do antigeno amarillico, realizámo varias provas em sôros de doentes de febre typhoide, de typho exanthematico de outras doenças febris.

O quadro abaixo dá os resultados que obtivemos:

Soros de doentes de	Negativos	Positivos fracos	Positivos fortes
Febre typhoide	18	0	2
Typho exanthematico . . .	5	1	0
Doenças febris	13	1	2

Os commentarios que fizemos em nosso primeiro trabalho cabem aqui pa a explicação da percentagem, embora pequena, de resultados positivos com sôro de pessoas residentes em S. Paulo e de doentes de outras infecções: taes resu tados explicar-se-iam pelo facto de algumas destas pessoas terem, possivelment residido em zonas onde a febre amarella haja existido endemicamente, apez de que não nos foi possivel confirmar esta suspeita que se justifica, em tod caso, pelos resultados com os sôros das pessoas residentes na Bahia.

CONSIDERAÇÕES EM TORNO DO ANTIGENO E DOS ANTICORPOS AMARILLICOS

Hadjopoulos e Burbank (4) consideram um antigeno como composto de moleculas dissimilares: a molecula immunogenica, isto é, fracção productora anticorpos e a molecula immunophilica ou fracção reactora aos anticorpos. K

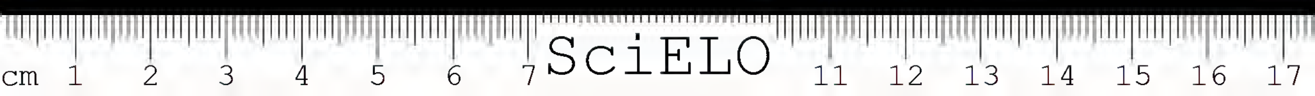
mer (5), do mesmo modo, julga necessario discutir o papel de um antigeno sob dois aspectos: em relação á producção de anticorpos e em relação á inter-reacção com anticorpos *in vitro* no que diz com a fixação do complemento.

No caso presente, directamente só poderemos estudar a qualidade antigenica do nosso soluto *in vitro*, isto é, em relação aos anticorpos fixadores do complemento ou, como diria Burbank, á sua fracção immunophilica, por isso que, sendo o nosso antigeno um soluto chimicamente complexo, onde proteinas, lipoides, hydratos de carbono, etc. formam compostos indefinidos ou ainda não estudados, não poderiamos saber a qual destes está ligado o papel de antigeno. Se, com effeito, injectarmos em animaes de especies differentes, em dóses crescentes, o soluto antigenico e, após o preparo do animal, procurarmos no sôro anticorpos fixadores, usando como antigeno o mesmo soluto, é forçoso que os encontraremos, por isso que os complexos proteino-lipoidicos, lipoides livres, e outros, por si sós, independentemente da substancia especifica, são capazes de provocar a formação de anticorpos. Não resta duvida de que o sôro de cavallo inoculado com o virus (figado), que goza, de accordo com as verificações de Pettit e seus collaboradores (6), de poder protector para o *rhesus*, contém anticorpos fixadores do complemento, como se pode verificar no quadro abaixo:

Soros anti-amarillico do	Testemunhas do soro: Unidades complementares				Reacção: Unidades complementares			
	2	3	4	5	2	3	4	5
Instituto Pasteur. . .	+	—	—	—	+ + +	+ +	±	—
Instituto Butantan . .	—	—	—	—	+ + + +	+ + +	+ +	+

Mas, como poderemos affirmar que esses anticorpos fixadores do complemento são especificos para a porção immunogenica do antigeno, se como antigeno na reacção usamos o mesmo complexo chimico que foi inoculado no animal? Os anticorpos fixadores poderiam ser especificos, tanto para o virus propriamente dito, como para os complexos proteino-lipoides do figado.

Indirectamente, porém, podemos ter a prova de que o nosso antigeno possúe a fracção immunogenica: com effeito, dos *rhesus*, inoculados com figados que nos serviram para o preparo do antigeno, alguns ficaram infectados e morreram de febre amarella, outros resistiram á infecção e apresentaram em seu sôro quantidade apreciavel de anticorpos que fixam o complemento em face de um antigeno preparado com o figado de *rhesus* infectado, mas que não o fixam em face de um antigeno preparado com figado de *rhesus* normal, conforme as verificações tambem de Frobisher Jor. Por outro lado, sabe-se que os sôros de *rhesus* immunizados e os de convalescentes de febre amarella gozam da propriedade de proteger os animaes sensiveis contra o virus e, pelas verificações por nós realizadas, esses sôros possuem, em regular quantidade, anticorpos fixadores do complemento. Isso não quer dizer, entretanto, que o poder de protecção corra só por conta dos anticorpos fixadores do complemento, mas que estes dois anticorpos podem exis-



tir concomitantemente, sobretudo no periodo de convalescença, podendo perdurar por periodo mais ou menos longo, sendo os ultimos (os fixadores do complemento) mais facilmente eliminados, conforme as nossas investigações nesse sentido.

O antigeno contém seguramente o virus amarillico, conforme se demonstra pela inoculação do figado, de que foi preparado, em *Macacus rhesus*. Um dos antigenos com que realizámos a maioria das reacções deste trabalho, provinha do *rhesus* 102, cujo virus fora utilizado para inoculação do *rhesus* 105, que teve infecção caracteristica e morte em 5 dias, sendo transferido para o *rhesus* 108 que tambem morreu em 5 dias, após infecção typica, e, assim por diante, através de outras passagens; o *rhesus* 103, inoculado com dose muito reduzida de uma emulsão de figado do mesmo *rhesus* 102, teve apenas reacção febril, resistindo á infecção, mas a reacção praticada então com o seu sôro (apenas 0,05 cc.) deu resultado fortemente positivo (++++).

Por outro lado, poder-se-ia provar indirectamente a existencia da fracção immunogenica no antigeno, pela prova de protecção dos sôros contendo anticorpos fixadores do complemento em relação á infecção experimental. O quadro abaixo mostra esta verificação por nós realizada e o resultado obtido:

Prova de protecção do Macacus rhesus com sôros contendo anticorpos fixadores do complemento

Soro de	Resultados da reacção	Animaes de prova	Testemunhas	Resultados da protecção
P. F. N., convalescente de febre amarella.	++++	Rhesus 107, inocul. c/ 2cc. de soro P. F. N., em 21-7-30; inocul. c/ virus (2cc. sangue do rhesus 105), em 22-7-30. Nada de anormal apresentou.	Rhesus 108, inocul. em 22-7-30 c/ virus (2cc. sangue do rhesus 105). Morte em 25-7-30 c/ lesões typicas.	Positivo
O. A. P. Guimarães, normal, residente na Bahia.	++++	Rhesus 120, inocul. em 12-8-30 c/ 2cc. de soro O. A. P. G.; em 13-8-30 inocul. c/ virus (2cc. de sangue rhesus 119). Nada de anormal apresentou.	Rhesus 122, inocul. em 13-8-30 c/ virus (2 cc. sangue do rhesus 119). Evolução caracteristica, hypothermia, sacrificado em 21-8-30, apresentando lesões typicas.	Positivo
J. Magalhães, normal, residente na Bahia.	++++	Rhesus 121, inocul. em 12-8-30 c/ 2cc. de soro J. M.; em 13-8-30 inocul. c/ virus (2cc. sangue do rhesus 119). Nada de anormal apresentou.		Positivo

Indirectamente, pois, poderemos provar que no nosso antigeno existe a fracção immunogenica.

Para o estudo da fracção immunophilica basta verificar os resultados das reacções nos sôros dos *rhesus* immunizados, das pessoas convalescentes e das

immunes á febre amarella. A percentagem elevada de resultados positivos dispensa-nos qualquer commentario.

Tratando-se, contudo, de um antigeno chimicamente complexo, não podemos assegurar que este se fixa unicamente ao anticorpo especifico amarillico, por ventura existente nos sôros humanos. A prova realizada nos sôros de extrangeiros recentemente chegados ao paiz que, como se sabe, são os mais sujeitos á infecção, dá-nos margem, entretanto, para julgarmos que o antigeno possue certa especificidade.

DISCUSSÃO E SUMMARIO

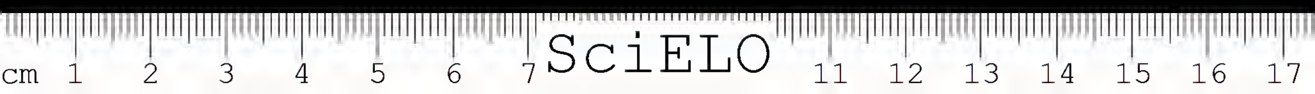
As considerações feitas no inicio da nossa 1.ª nota mostram a importancia que apresenta o estabelecimento de um diagnostico sôrologico da febre amarella para a confirmação do diagnostico clinico, nos casos em que este apresenta difficuldades, como acontece no principio das epidemias, nos casos benignos, formas frustras, etc..

Assignalamos tambem as pesquisas que, nesta nova phase do estudo da febre amarella, foram feitas por differentes pesquisadores.

Os resultados obtidos com a reacção de fixação do complemento, com sôros de pessoas convalescentes de febre amarella e de immunes, com sôros de *rhesus* nos varios periodos da infecção, bem demonstram a possibilidade de um diagnostico post-infecção, muitas vezes necessario para comprovar a suspeita de um caso que se revele por uma forma clinica frustra ou susceptivel de confusão com outros estados morbidos. A prova de protecção realizada em *rhesus* é dispendiosa e muitas vezes inaccessivel entre nós, por falta de animaes em abundancia.

A reacção de fixação do complemento sendo positiva no decurso ou depois de uma infecção suspeita clinicamente poderá ser discutida, quando se tratar de um nacional residente ou tendo residido em zona em que a febre amarella é endemica. Tratando-se, porém, de um extrangeiro recentemente chegado ao paiz e provindo de região indemne, o resultado positivo parece revelar seguramente a infecção.

Como referimos no decorrer deste trabalho, o antigeno que usamos deve apresentar em sua molecula as fracções immunogenica e immunophilica, o que lhe empresta valor de especificidade, mas não podemos assegurar que nos sôros humanos não existam outros anticorpos, além do especifico ao virus, capazes por sua vez de, em presença deste, fixarem o complemento. As provas de protecção realizadas nos *rhesus* com sôros de nacionaes que apresentavam um resultado fortemente positivo, alem dos resultados sempre negativos da reacção em sôros de extrangeiros recentemente chegados ao paiz, falam, entretanto, a favor de uma certa especificidade desses anticorpos. Essas mesmas provas vêm mostrar que tambem ha causa de erro na prova de protecção: tratando-se de um doente, nacional e oriundo de fóco endemico, ella perde o valor, do mesmo modo que a prova de fixação do complemento.



CONCLUSÕES

I. A infecção amarillica, tanto humana como experimental, depois de certo periodo da evolução, na convalescença e nos immunizados, pode ser diagnosticada por uma reacção baseada na fixação do complemento.

II. Para esta reacção o antigeno será preparado com figado de *rhesus* infectado, tratado por processo especial que liberte a maior quantidade possivel do virus. Este antigeno apresenta especificidade e sensibilidade na infecção, tanto humana como experimental.

III. Os sôros de nacionaes residentes em zonas onde o mal é endemico, em proporção de quasi 50 %, contêm anticorpos fixadores do complemento, o que não acontece com os sôros de extrangeiros recemchegados ao paiz.

IV. Conforme se passa com os sôros de convalescentes, os sôros de nacionaes contendo anticorpos fixadores do complemento (reacção com ++++), são capazes de proteger o *Macacus rhesus* em relação á infecção experimental.

V. Tratando-se de sôros de nacionaes oriundos de zonas de endemia amarillica, este facto poderá falsear os resultados da reacção quanto ao diagnostico post-infecção, o que tambem se dará com a simples prova de protecção do *rhesus* pelo sôro de convalescente.

CONCLUSIONS

I. The diagnosis of yellow fever, both human and experimental may be based on the complement fixation reaction made in the course of the infection, in the convalescence and after complete recovery.

II. The antigen for this reaction must be prepared from the liver taken from infected *rhesus* monkeys and ground in a way that may set free as much virus as possible. The antigen thus prepared shows both specificity and sensitiveness to the infection.

III. The sera of natives living in places where the disease is endemic show complement-fixing antibodies in about 50 % of the cases, whilst those of newly arrived foreigners give negative results.

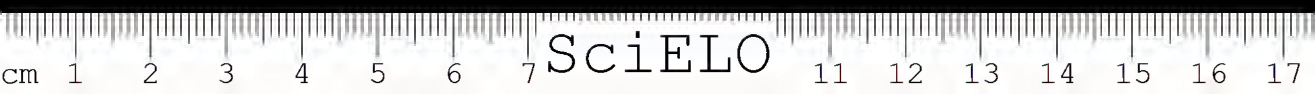
IV. The sera of natives containing complement-fixing antibodies (++++ reactions), like those of convalescents, afford the *rhesus* protection against yellow fever.

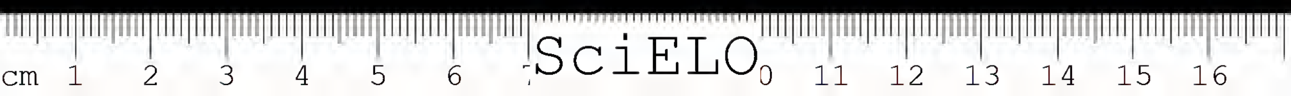
V. This indeed may mislead one in the interpretation of the results, should the reaction be made on material from persons living in the endemic zone, but the *rhesus* protection test made with convalescent's serum will act likewise.

REFERENCIAS

(1) - *Monteiro, J. Lemos e Travassos, J.* — Brasil Medico (14):313.1930.
(2) - *Hindle* — Repr. from Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. XXII(5):405.1929.
(3) - *Frobisher, Jor.* — Repr. from Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. XXVI:846.1929.
(4) - *Hadjopoulos e Burbank* — J. Lab. Clin. Med. (12):972.1927.
(5) - *Kolmer* — Serum diagnosis by complement fixation, 1928 - Philadelphia, Lea & Febiger.
(6) - *Pettit, Stefanopoulo et Frasey* — C. R. Soc. Biol. XCIX(28):1114.1928.

(Trabalho das Secções de Virus e de Immunologia do Instituto Butantan, terminado em outubro de 1930).

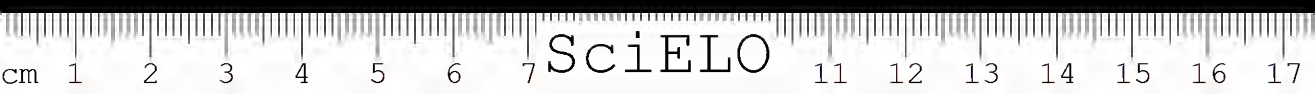


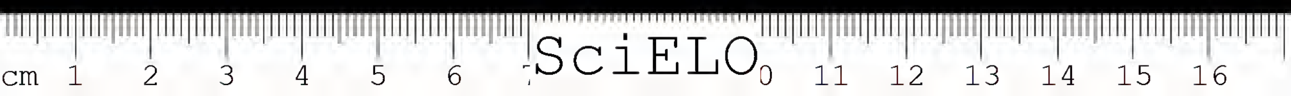

SciELO

CAMPANHAS ANTI-OPHIDICAS

POR

AFRANIO DO AMARAL




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16

CAMPANHAS ANTI-OPHIDICAS

POR

AFRANIO DO AMARAL (*)

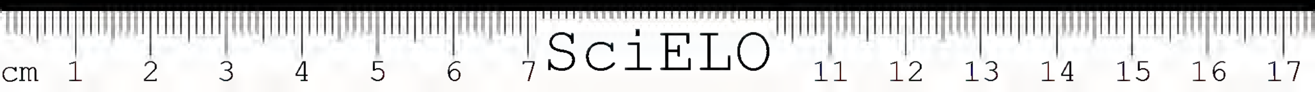
SERPENTES VENENOSAS

Antes de tratar propriamente de campanhas anti-ophidicas, parece-me razoavel que eu diga algumas palavras sobre o conceito scientifico de serpentes venenosas. Aqui cumpre distinguir entre o criterio especulativo e o pratico. Do ponto de vista physiologico e anatomico, venenosos são quasi todos os ophidios, porquanto possuem glandulas que secretam productos capazes de exercer toxicidade sobre esta ou aquella especie animal. No entanto, do ponto de vista medico e hygienico, só se devem considerar venenosas aquellas serpentes que, por possuirem abundante secreção e serem dotadas de apparelho inoculador em ligação com a glandula de veneno, são capazes de injectar facilmente este producto nos tecidos animaes. Estão neste caso os ophidios pertencentes á serie dos proteróglyphos ou á dos solenóglyphos, a primeira das quaes se caracteriza pela presença de dentes maxillares anteriores (presas) chanfrados ou mais ou menos perfurados (Fig. 1), e a segunda, pelo encurtamento do osso maxillar que, alem disso, é movel perpendicularmente em relação ao ectopterygoide e ligado de cada lado a uma grande presa tubular, cujo canal communica com o ducto excretor de veneno (Fig. 2).

A serie proteróglypha é representada no Brasil apenas pelas chamadas "Cobras coraes verdadeiras", as quaes, todavia, por não serem propensas a picar e por viverem rarissimamente na superficie do solo, não constituem problema para o hygienista.

A serie solenóglypha corresponde em nosso meio á familia das Crotalideas, as quaes se distinguem das demais pela presença de dois orificios de cada lado do focinho: um anterior que é a narina e outro posterior que é a fosseta lacrimal (Fig. 3). *Nestas condições, para a immediata distincção dos ophidios não vene-*

(*) Os dados constantes deste trabalho foram usados, em grande parte, na conferencia que, sobre o assumpto, realizei perante o V Congresso Brasileiro de Hygiene.



nosos e venenosos é da maxima importancia a observação desses dois orificios faciaes, porquanto nenhum outro grupo de ophidios, alem das Crotalideas, nem mesmo o das "Coraes venenosas", os apresenta.

As Crotalideas, divididas em duas subfamilias (Crotalineas e Lachesineas), estão até agora representadas no nosso territorio por tres generos, subdivididos pelas dezeseis especies seguintes:

I. Genero *Crotalus* LINNEU, representado por uma só especie no Brasil:

1. *C. terrificus* (LAURENTIUS), a Cascavel, abundantissima em todas as zonas seccas ou altas do país.

II. Genero *Lachesis* DAUDIN, que é monotypico, isto é, possue uma unica especie:

2. *L. muta* (LINNEU), a Surucucú, encontradiça nas mattas do centro, littoral (do Rio para o norte) e valle do Amazonas e Paraguay. E' esta a serpente solenóglypha que attinge maior comprimento em todo o mundo (pelo menos tres metros).

III. Genero *Bothrops* WAGLER, cujas especies podem ser assim discriminadas, pela ordem de sua abundancia e importancia medica ou economica:

3. *B. jararaca* (WIED), a Jararaca, muito commum desde a Bahia e o planalto central até o extremo sul, onde habita os campos e logares relativamente planos.

4. *B. atrox* (LINNEU), a Caissaca, abundante desde São Paulo, Minas Geraes e Matto Grosso até o extremo norte, onde substitue a Jararaca.

5. *B. jararacussu* LACERDA, a Jararacussú, encontrada em logares baixos e humidos, frequentemente á margem de rios e banhados.

6. *B. alternata* DUMÉRIL & BIBRON, a Urutú, que é propria da zona central e meridional, onde vive em logares seccos ou pedregosos, preferindo a chamada zona de terra vermelha.

7. *B. neuwiedii* WAGLER, a Jararaca pintada, distribuida desde o Rio Grande do Sul e Matto Grosso até o nordeste, onde substitue a Urutú, pois tambem occorre em logares seccos ou mesmo semi-aridos e pedregosos.

8. *B. cotiara* (GOMES), a Cotiara, que se encontra desde a região da Serra do Mar no sudeste de Minas, e de São Paulo para o sul, especialmente no Paraná e Santa Catharina.

9. *B. bilineata* (WIED), a Surucucú de patioba, propria do norte do Rio de Janeiro até a região nordestina e o valle do Amazonas.

10. *B. itapetiningae* (BOULENGER), a Cotiarinha, especie propria do interior de São Paulo (Fig. 13).

11. *B. castelnaudi* DUMÉRIL & BIBRON, a Jararaca cinzenta, relativamente rara mesmo nos valles do Amazonas e Paraguay e no planalto central, donde é originaria (Fig. 14).

12. *B. insularis* (AMARAL), a Jararaca ilhoa, restricta á Ilha da Queimada Grande no littoral de São Paulo (Fig. 15).

13. *B. erythromelas* AMARAL, a Jararaca da secca, até agora assignalada apenas na zona secca do nordeste (Bahia até Ceará) (Fig. 16).

14. *B. iglesiasi* AMARAL, oriunda do sertão do Piauhy (Fig. 17).

15. *B. pirajai* AMARAL, procedente da região meridional da Bahia (Fig. 18).

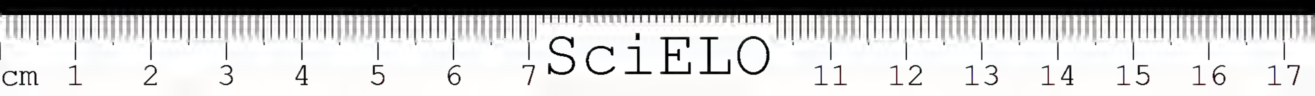
16. *B. neglecta* AMARAL, tambem originaria da Bahia (Fig. 19).

TRATAMENTOS EMPIRICOS

E' sabido que, especialmente entre a classe baixa, muita gente ainda acredita que mordedura de cobra passa com remedios caseiros, cuja base é em via de regra o alcool ou o kerozene. Assim, tanto no Brasil, como nos demais países americanos, é frequente se verem pessoas, picadas por serpentes, procurar beberagens com base de alcool, sendo que nos Estados Unidos, em virtude da lei secca, muitos pretos se fazem propositalmente picar por cobras não venenosas só para terem direito a uma dose de whiskey de que sentem tanta falta... No entanto, experiencias realizadas com todo o rigor scientifico têm demonstrado que o alcool, longe de curar ou siquer facilitar a cura, pelo contrario a difficulta, porque a principio favorece a absorpção do veneno e, mais tarde, em resultado da baixa da pressão sanguinea, retarda a reacção do organismo e a eliminação do toxico.

No que diz com o kerozene, os effeitos observados ainda são mais prejudiciaes. Alem de não ter acção qualquer benefica sobre o envenenamento, o kerozene, ingerido nas doses que o povo emprega, complica os symptomas, porque por si só produz uma intoxicação aguda, com destruição do sangue e degeneração do figado.

Ha dois annos, tive ensejo de soccorrer a um trabalhador, recemchegado de Portugal, que, ao ser picado por uma cascavel nos arredores da cidade de São Paulo, foi obrigado a ingerir cerca de meia garrafa de kerozene que lhe administraram os companheiros de trabalho. Apezar da applicação intensiva do antiveneno especifico (sôro anti-crotalico), esse paciente não poude reagir, vindo a fallecer no dia seguinte com todos os symptomas de envenenamento pelo kerozene. Ainda ha pouco tempo, tive sob observação uma franzina menina de 7 annos, residente á margem da estrada de São Paulo a Itú e que, depois de um copioso almoço, se viu, em certo domingo, picada por uma cascavel que foi morta e trazida ao Instituto para identificação. Ao examinar o ophidio, dei pela falta do *crepitaculum* (chocalho) e, ao ser notificado da morte da doente, apezar do tratamento especifico, tratei de averiguar o que os parentes da victima haviam feito com esse appendice. Fui então informado de que o mesmo havia sido triturado e posto em um copo de kerozene que foi dado a beber á desventurada criança.



Logo depois deste caso, observei um outro de um menino de 12 annos de idade residente em um velho sitio alem do Ypiranga, no municipio de São Paulo, o qual fora mordido por uma cascavel no momento em que estava trabalhando na roça. Soccorrido pelo pai que conseguiu matar a serpente causadora do accidente, recebeu essa criança, como medicação de urgencia, uma "boa dose" de cachaça com alho grande, na crença de ter ingerido um antidoto efficaz. Não havendo naturalmente o remedio produzido o effeito desejado, foi a victima, já em estado grave, trazida ao Instituto Butantan pelo proprio pai que, ao ser inquirido sobre o accidente e a medicação usada, declarou que administrara a pinga com alho, só não tendo augmentado a dose para um copo, por se ter o offendido recusado a ingerir mais, devido aos vomitos que provocava. Para fazer face ao envenenamento dessa criança foram necessarias 9 empolas de sôro anti-crotalico injectadas por via sub-cutanea, intravenosa e intraperitoneal, de mistura com cerca de meio litro de agua physiologica com adrenalina, seguido de estrychnina e cafeina.

A minha primeira experiencia com tratamentos dessa natureza passou-se ha cerca de nove annos, quando tive conhecimento de um caso de envenenamento ophidico cuja unica "medicação" consistira em couro de jacaré administrado com "pinga e oleo de candeia". Bem se vê que, enquanto perdurar tamanha ignorancia entre o povo, ha de ser moroso o progresso que poderemos fazer em nossas campanhas de prophylaxia. No sul do Brasil, nos pontos em que a instrucção está mais disseminada, e nos Estados Unidos, onde todos procuram aprender para melhorar e enriquecer, os resultados da campanha anti-ophidica têm sido proporcionaes ao adiantamento do meio.

COMBATE AO OPHIDISMO

No combate ao ophidismo estão comprehendidas varias medidas, todas correlatas e interdependentes, mas que devem ser postas em execução gradativa e systematicamente afim de se assegurar o completo exito da campanha:

1.ª Determinação das especies de serpentes venenosas de importancia medica e estudo de sua distribuição geographica.

2.ª Captura systematica de taes serpentes, vivas.

3.ª Pesquisa dos phenomenos physiologicos e immunologicos dos venenos.

4.ª Preparo de antivenenos (sôros anti-peçonhentos) de accordo com os typos mais importantes de peçonha, e emprego de meios mechanicos complementares de defesa contra as picadas.

5.ª Organização de estatistica sobre ophidismo e sobre o resultado da applicação de antivenenos no tratamento de picadas.

Infelizmente, os unicos paises que têm seguido consistentemente essa orientação na lucta contra os ophidios venenosos, têm sido o Brasil e os Estados Unidos. Entre nós, graças á visão de Vital Brazil que cedo se deu conta da importancia do problema do ophidismo para as populações ruraes do país, creou-se no Instituto Butantan, sob a sua orientação, uma organização capaz de levar avante a patriotica campanha que tão assignalados resultados tem produzido, conforme vou tentar demonstrar neste trabalho, repetindo muito embora alguns factos sobejamente conhecidos. Nos Estados Unidos, em resultado da crescente actividade do Antivenin Institute of America, cuja organização, bastante vasta e elastica, tem permittido um ataque á questão nos diversos pontos de sua immensa zona rural, os fructos colhidos têm sido tantos e tão importantes, que permittem esperar-se para breve a completa eliminação do ophidismo como factor de mortalidade.

Aqui, como ali, a campanha tem sido orientada nos modelos por mim acima apontados, já estando em franca execução, entre nós ha mais de 25 annos, e na America do Norte ha apenas tres annos, as medidas referentes ao estudo e á captura de serpentes venenosas e as pesquisas sobre venenos e preparo de antivenenos. Quanto á ultima medida indicada e que se refere á organização de estatisticas sobre o ophidismo e sobre o resultado do tratamento especifico, o Instituto Butantan tem della, em vezes varias, cogitado, conforme publicações feitas por alguns de seus membros. De seu lado, o Antivenin Institute of America acaba de demonstrar, no numero 2, vol. III do seu "Bulletin", o surprehendente e rapido successo da actividade que se vem exercendo naquelle país amigo.

O OPHIDISMO NO BRASIL

Vejamos, em primeiro logar, como no particular se tem exercido a actividade do Instituto Butantan, á luz dos annexos graphicos, referentes á entrada de serpentes, englobadamente ou por especies e grupos, á producção de antivenenos e á mortalidade por picadas.

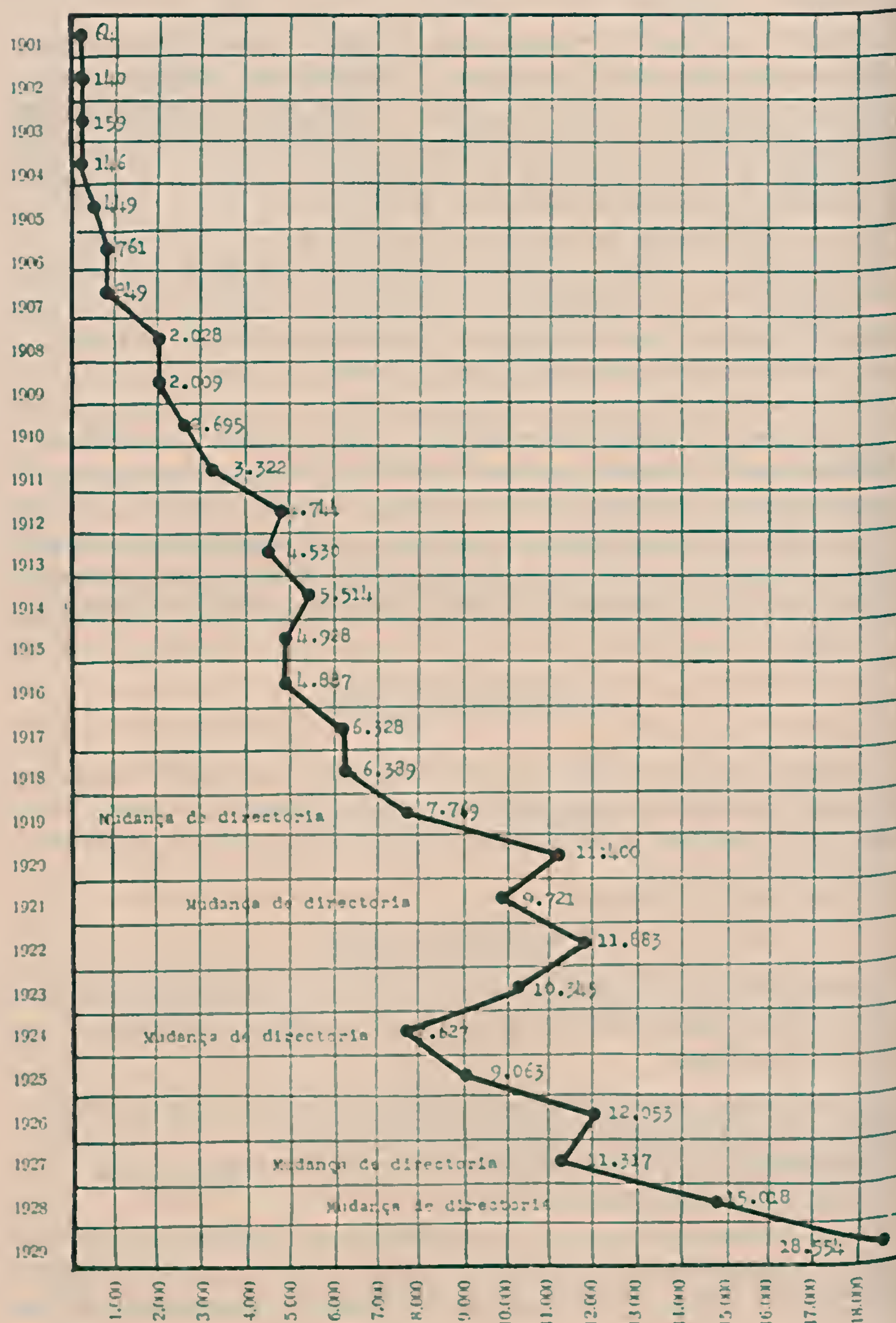
a) Entradas de serpentes

O Instituto prepara actualmente e em larga escala os seguintes antivenenos ophidicos (sôros contra picada de serpentes) para distribuição, sobretudo á zona rural do sul do Brasil:

1. Antiveneno crotalico (sôro anti-crotalico) monovalente, contra a nossa especie de Cascavel, *Crotalus terrificus* (Laurentius).
2. Antiveneno bothropico (sôro anti-bothropico) monovalente, contra a Jararaca, *Bothrops jararaca* (Wied).
3. Antiveneno bothropico (sôro anti-bothropico) polyvalente, contra as especies mais communs de *Bothrops* brasileiras, isto é, a Jararaca ou *Bothrops jararaca* (Wied), a Caissaca ou *Bothrops atrox* (Linneu), a Jararacussú ou *Bothrops*

QUADRO I

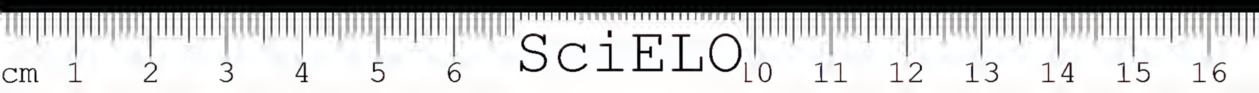
Curva de entrada de serpentes no Instituto Butantan



QUADRO II

QUADRO DEMONSTRATIVO DAS SERPENTES RECEBIDAS PELO INSTITUTO BUTANTAN DE 1901 A 1929

ESPECIES	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	1919	1920	1921	1922	1923	1924	1925	1926	1927	1928	1929	Totaes
1 — *C. terrificus* (Laurenti.)	—	—	—	—	—	120	380	960	955	1.258	1.305	1.737	1.305	1.636	1.463	1.125	1.616	1.961	2.002	2.428	2.337	2.477	2 396	2.187	2.080	2.372	3.262	4.627	5.209	47.198
2 — *B. jararaca* (Wied)	—	—	—	—	—	46	251	399	350	462	687	1.037	913	1.013	1.198	1.612	1.723	1.659	2.648	4.477	3.759	5.587	4 690	3.161	4.220	5.701	4.417	5.751	7.579	63.340
3 — *B. alternata* D. & B.	—	—	—	—	—	24	106	155	180	222	267	311	281	284	322	295	301	372	342	310	323	423	254	256	265	347	349	347	440	6.776
4 — *B. atrox* (L.)	—	—	—	—	—	—	—	57	79	70	142	172	69	111	118	133	82	116	144	174	196	210	164	113	120	191	179	320	427	3.387
5 — *B. jararacussu* Lacerda	—	—	—	—	—	4	19	42	39	50	83	170	183	161	122	127	147	106	129	185	111	149	162	123	66	138	176	224	291	3.007
6 — *B. cotiara* (Gomes)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17	60	46	28	54	144	217	169	193	197	189	270	202	187	213	2.186
7 — *B. neuwiedii* Wagler	—	—	—	—	—	5	11	93	72	144	198	309	263	336	224	207	191	235	348	404	351	370	321	215	265	284	325	537	590	6.298
8 — *B. itapetiningae* (Boulenger)	—	—	—	—	—	—	3	9	9	8	3	5	2	7	5	3	2	7	4	25	4	5	12	—	4	8	3	11	11	150
9 — *B. insularis* (Amaral)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	97	106	141	95	40	—	24	—	—	—	—	—	503
10 — *B. iglesiasi* (Amaral)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21
11 — *B. bilineata* (Wied)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	2	—	—	—	—	—	—	5
12 — *B. erythromelas* Amaral	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
13 — *B. neglecta* Amaral	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
14 — *B. pirajai* Amaral	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
15 — *Lachesis muta* (L.)	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	2	1	1	—	3	—	—	1	—	1	3	—	1	—	4	—	1	2	—	21
16 — *Micrurus corallinus* (Wied)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14	17	11	27	15	30	21	36	24	58	92	158	130	83	52	52	47	60	40	967
17 — *M. frontalis* (D. & B.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9	13	17	21	10	4	14	14	12	17	15	29	15	15	12	29	22	25	34	327
18 — *M. lemniscatus* (L.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	1	2	1	2	4	4	3	7	8	3	5	14	11	15	17	100
19 — *M. decoratus* (Jan)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	8	2	—	1	18
20 — *M. fischeri* (Amaral)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
21 — *M. filiformis* (Günther)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
22 — Especies não venenosas	—	—	—	—	—	19	71	307	315	476	612	971	1.480	1.916	1.430	1.289	2.184	1.734	1.952	3.030	2.206	2 253	1.997	1.249	1.781	2.638	2.309	2.836	3.177	38.232
23 — Não classificadas	64	140	159	146	449	543	8	5	10	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	—	—	—	—	—	—	—	1.535
24 — Especies venenosas extrangeiras	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	12	60	143	216
25 — Especies não venenosas extrangeiras	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	382	398
TOTAES	64	140	159	146	449	761	849	2.028	2.009	2.695	3 322	4.744	4.530	5.514	4.928	4.887	6.328	6.389	7.769	11.400	9.721	11.883	10 345	7.627	9.063	12.053	11.317	15.018	18.554	174.692


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

jararacussu Lacerda, a Urutú ou *Bothrops alternata* Dm. & Bibr., a Jararaca pintada ou *Bothrops neuwiedii* Wagler e a Cotiara ou *Bothrops cotiara* (Gomes).

Afim de attender á intensa procura de seus antivenenos, o Instituto tem necessidade de manter um grande stock de venenos, convenientemente preparados para fazer face á immunização de muitos animaes. Por esta razão, ao tempo que distribue folhetos e gravuras de propaganda contra o ophidismo, o Butantan remette a todos os interessados laços e caixas destinados, respectivamente, á captura e ao transporte de ophidios da zona rural para sua séde. Esse serviço, organizado por Vital Brazil, logo após a fundação do Instituto, tem sido gradativamente ampliado e aperfeiçoado afim de attender ás necessidades do momento.

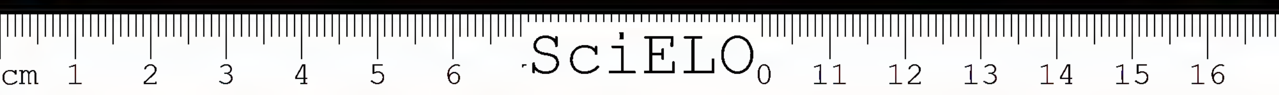
Em resultado da intensiva campanha que vem fazendo junto aos agricultores para a captura systematica de serpentes e sobretudo das especies venenosas, porventura encontradas em suas plantações e culturas, o Instituto tem conseguido um numero crescente de exemplares, cuja discriminação consta do quadro I.

A analyse do quadro I revela que a curva de entrada de serpentes tem subido progressivamente, havendo apenas soffrido ligeiras oscillações para menos, em 1913, 1915 e 1916 e havendo depois baixado mais nitidamente em 1921, 1923-1924 e 1927, annos esses que correspondem a mudanças na directoria do Instituto. De outro lado, houve uma reacção com nitido avanço nas entradas, em 1922 e 1926, em resultado da normalização do serviço e especialmente em 1920 e 1928, em consequencia da intensificação da propaganda anti-ophidica pela zona rural, nessas occasiões. Devo acrescentar que o record attingido neste anno, quando recebemos 18.554 serpentes, será ainda ultrapassado no anno proximo, a julgar pelo interesse demonstrado por grande numero de pessoas residentes no interior.

b) Entradas de serpentes por especies

Um relancear d'olhos pela columna que no quadro II representa o numero total de serpentes, por exemplares recebidos até 1929 pelo Instituto Butantan, revela que, fazendo-se abstracção das não venenosas que occupam o terceiro logar na estatistica, a Jararaca vem em primeiro logar com 63.340 especimes e a Cascavel apparece logo em seguida com 47.198 especimes, surgindo depois, em ordem decrescente, a Urutú, a Jararaca pintada, a Caissaca, a Jararacussú, a Jararaca ilhoa, a Cotiarinha e outras menos communs. No genero *Lachesis*, sua unica especie, *L. muta* (Linneu), é representada apenas por 21 exemplares. No grupo das Coraes venenosas (serie proteróglypha), a especie que concorreu com maior numero foi *Micrurus corallinus* (Wied), vindo em seguida, em ordem decrescente, as especies *M. lemniscatus* (Linneu) e *M. decoratus* (Jan).

Dada a importancia que no problema ophidico brasileiro representam algumas das especies acima registadas, parece-me razoavel que eu dê aqui uma lista de seus nomes scientificos, ao lado de suas denominações populares:



A. Nome scientifico: *Crotalus terrificus* LAURENTIUS

(Fig. 4)

Designações vulgares: (*) Cascavel, Cascavel de quatro ventas (no Nordeste), Boicininga (Boiçuninga, Boicinunga ou Boiçununga), Maracá, Maracaboia e Boiquira.

B. Nome scientifico: *Lachesis muta* (LINNEU)

(Fig. 5)

Designações vulgares: Surucucú, Surucucú de fogo, Surucucú pico de jaca, Surucucutinga e Surucutinga.

C. Nome scientifico: *Bothrops jararaca* (WIED)

(Fig. 6)

Designações vulgares: Jararaca, nome aliás que nalguns pontos do Norte do Brasil se applica tambem á Caissaca (*B. atrox*), Jararaca dormideira, Jararaca preguiçosa, Jararaca da matta virgem, Jararaca do cerrado, Jararaca do campo, Jaraca e Jaracá.

Nota: Si as estatisticas de Butantan dissessem respeito mais ao Norte do que ao Sul do Brasil, o logar nellas occupado pela Jararaca seria certamente tomado pela Caissaca, especie abundantissima na zona septentrional.

D. Nome scientifico: *Bothrops atrox* (LINNEU)

(Fig. 7)

Designação vulgar: Caissaca, nome que em alguns pontos do norte do Brasil é substituido pelo de Jararaca.

E. Nome scientifico: *Bothrops jararacussu* LACERDA

(Fig. 8)

Designações vulgares: Jararacussú e Jararacussú verdadeiro. Esta especie é ainda conhecida pelos nomes de Jararacussú cabeça de sapo, Jararacussú malha de sapo, Jararacussú cabeça de patrona, Patrona, no Nordeste e especialmente na Bahia; Jararacussú tapete, Surucucú tapete, Cobra tapete, Tapete, Urutú, Urutú dourado, Urutú preto, Urutú amarello, Urutú estrella e Surucucú dourado, na região sudestina e especialmente nas zonas baixas dos Estados do Rio e Minas e no chamado "Norte" (Leste) de São Paulo, zona da Estrada de Ferro Central do Brasil.

(*) A respeito da significação e distribuição da maioria destes nomes vulgares no Brasil consulte-se: — Amaral, Afranio do — Nomes vulgares de ophidios do Brasil. Boletim do Museu Nacional II(2).1926.

F. Nome scientifico: *Bothrops alternata* Duméril & Bibron
(Fig. 9)

Designações vulgares: Urutú, Cruzeiro ou Cruzeira e Cotiara ou Coatiara, Jararaca rabo de porco (extremo sul do Brasil) e Jararaca de agosto (região da Lagoa dos Patos).

G. Nome scientifico: *Bothrops neuwiedii* Wagler
(Fig. 10)

Designações vulgares: Jararaca pintada, Boca de sapo, conforme é conhecida especialmente em Matto Grosso, e Rabo de osso, segundo é chamada no sertão de Goyaz.

Nota: Esta especie tem sido tambem chamada Jararaca de rabo branco, denominação que, alem de exprimir incorrectamente um caracter, tem o grande defeito de provocar confusão entre esta cobra e exemplares immaturos de Jararaca (*Bothrops jararaca*), os quaes têm a ponta da cauda branca. Na verdade, parece que um bom numero dos casos de accidentes attribuidos á "Jararaca de rabo branco", nos boletins recebidos pelo Instituto, foi determinado pela *B. jararaca* e não pela *B. neuwiedii*.

H. Nome scientifico: *Bothrops cotiara* (Gomes)
(Fig. 11)

Designações vulgares: Cotiara ou Coatiara, Boiquatiara, e Jararaca preta (no centro de Santa Catharina).

I. Nome scientifico: *Bothrops bilineata* (Wied)
(Fig. 12)

Designações vulgares: Surucucú de patioba, Surucucú de pindoba, Patioba, Surucucú pinta de ouro (no sertão da Bahia), Jararaca verde e Ouricana ou Uricana.

Nota: Embora na estatistica de Butantan não constem accidentes que se possam attribuir a esta especie, é certo que ella, por ser dendricola e possuir coloração protectora, constitue serio perigo sobretudo na região do Rio Doce e na zona cacaueira da Bahia, onde é frequente.

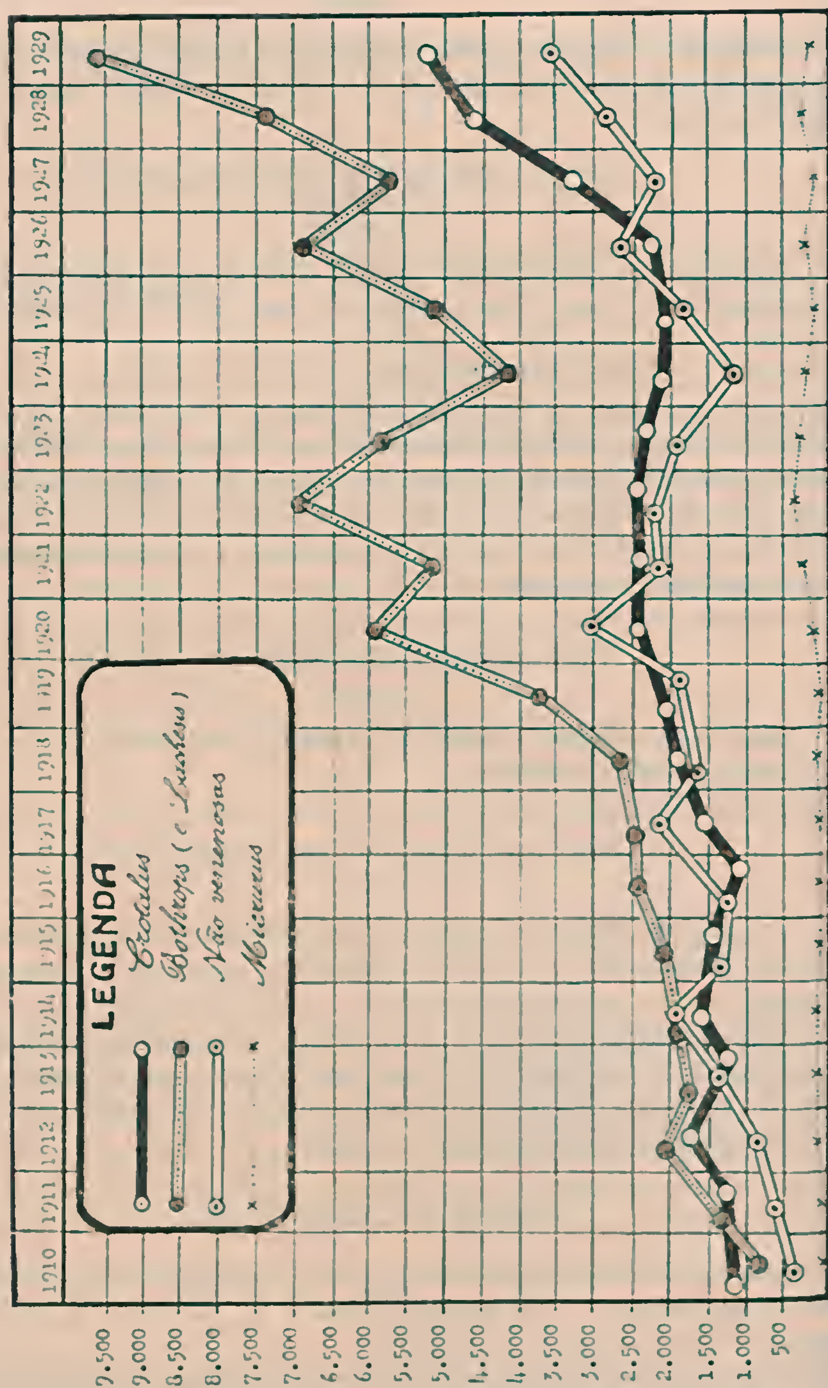
c) Entrada de serpentes por grupos

Fazendo-se a discriminação, em grupos, das serpentes mais importantes registadas nos Quadros I e II, obtem-se o quadro III que revela os seguintes pormenores relativos á curva de entradas:

O genero *Crotalus*, representado pela nossa Cascavel, esteve em ascenção constante no periodo de 1916 a 1921, quando começou a abaixar até o anno de

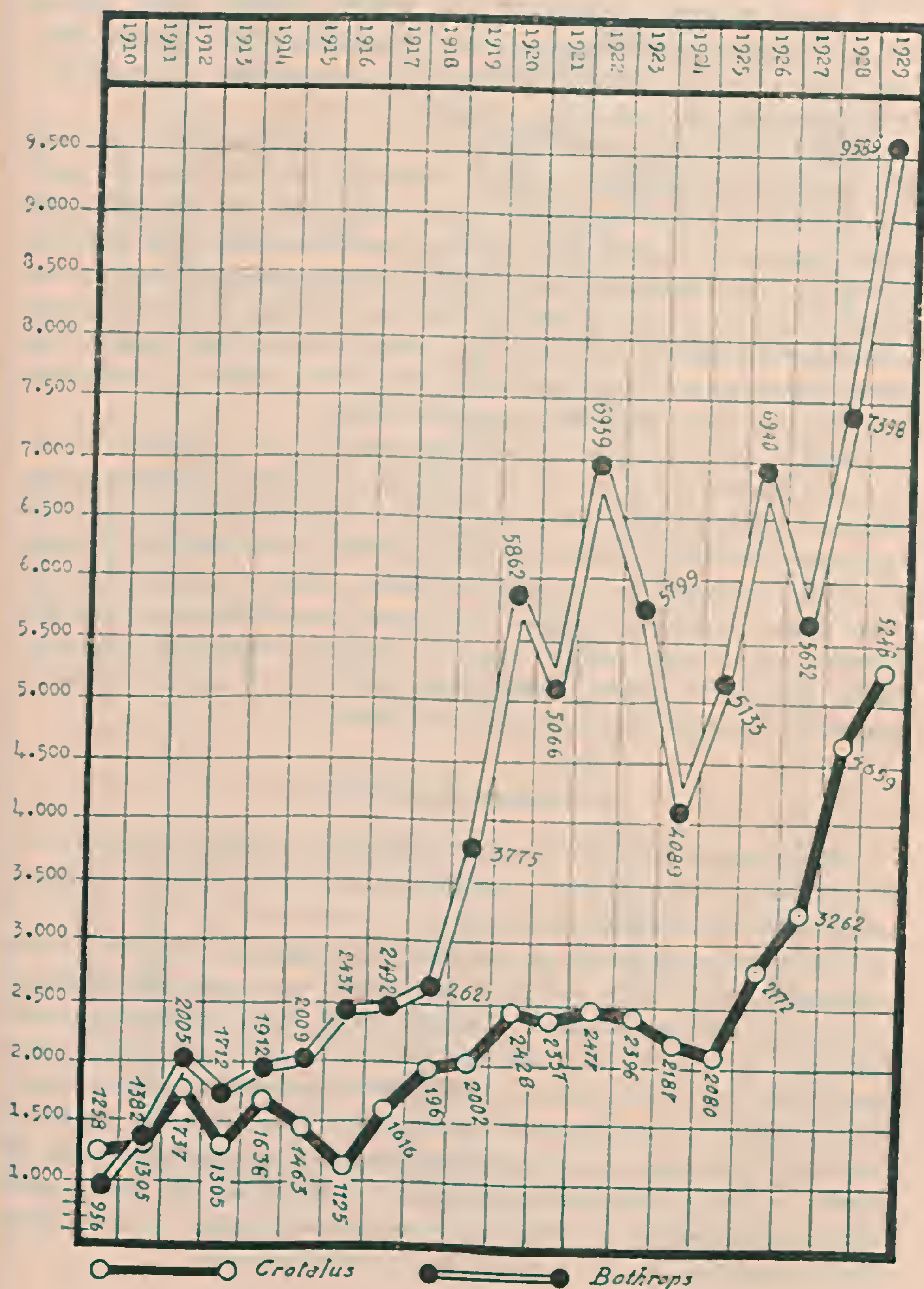
QUADRO III

Curva das entradas de *Crotalus*, *Bothrops*, não venenosas e *Micrurus* de 1910 a 1929



QUADRO IV

Entrada de *Crotalus* e *Bothrops* de 1910 a 1929



1925, reagindo desde então até 1927 e especialmente em 1928 e 1929, annos em que attingiu a mais do dobro do indicado pelo apice (1922) da curva de fluctuação anterior.

O genero *Bothrops*, representado pela Jararaca e especies affins, soffreu uma forte ascenção do periodo 1919 a 1920, descenção em 1921, havendo declinado abruptamente em 1923-1924 e em 1927 e augmentado, na mesma proporção, em 1925-1926 e em 1928 e 1929.

O genero *Micrurus*, representado pelas nossas Coraes venenosas, tem soffrido apenas ligeiras oscillações, havendo augmentado em 1921 e 1922, em resultado da intensiva campanha feita em 1920 e começo de 1921 em certas zonas em que, baseado na zoogeographia, sabiamos serem abundantes essas serpentes. O grupo das não venenosas, representado por grande numero de generos e especies, de que, no periodo de 1906 a 1929 foram recebidos 38.232 exemplares, tem apresentado algumas fluctuações, das quaes as mais nitidas foram os augmentos observados em 1914, 1917, 1920, 1926, 1928 e 1929 e as diminuições observadas em 1916 e 1918, 1921, 1923-1924 e 1927.

Sendo os venenos crotalico e bothropico mixto os mais necessarios ao Instituto, por servirem ao preparo de dois de seus antivenenos ophidicos, empregando-se o primeiro no dos antivenenos crotalico e ophidico e o segundo no dos antivenenos bothropico e ophidico, cumpre analysadas separadamente as curvas de entrada de serpentes dos dois generos *Crotalus* e *Bothrops*, conforme demonstração contida no quadro IV. Esse quadro indica mais claramente do que seus anteriores as oscillações que essa curva tem soffrido, cumprindo-me apenas informar agora que a ascenção, observada em relação a 1928 nas duas curvas, se reproduziu ainda mais intensamente no anno findo.

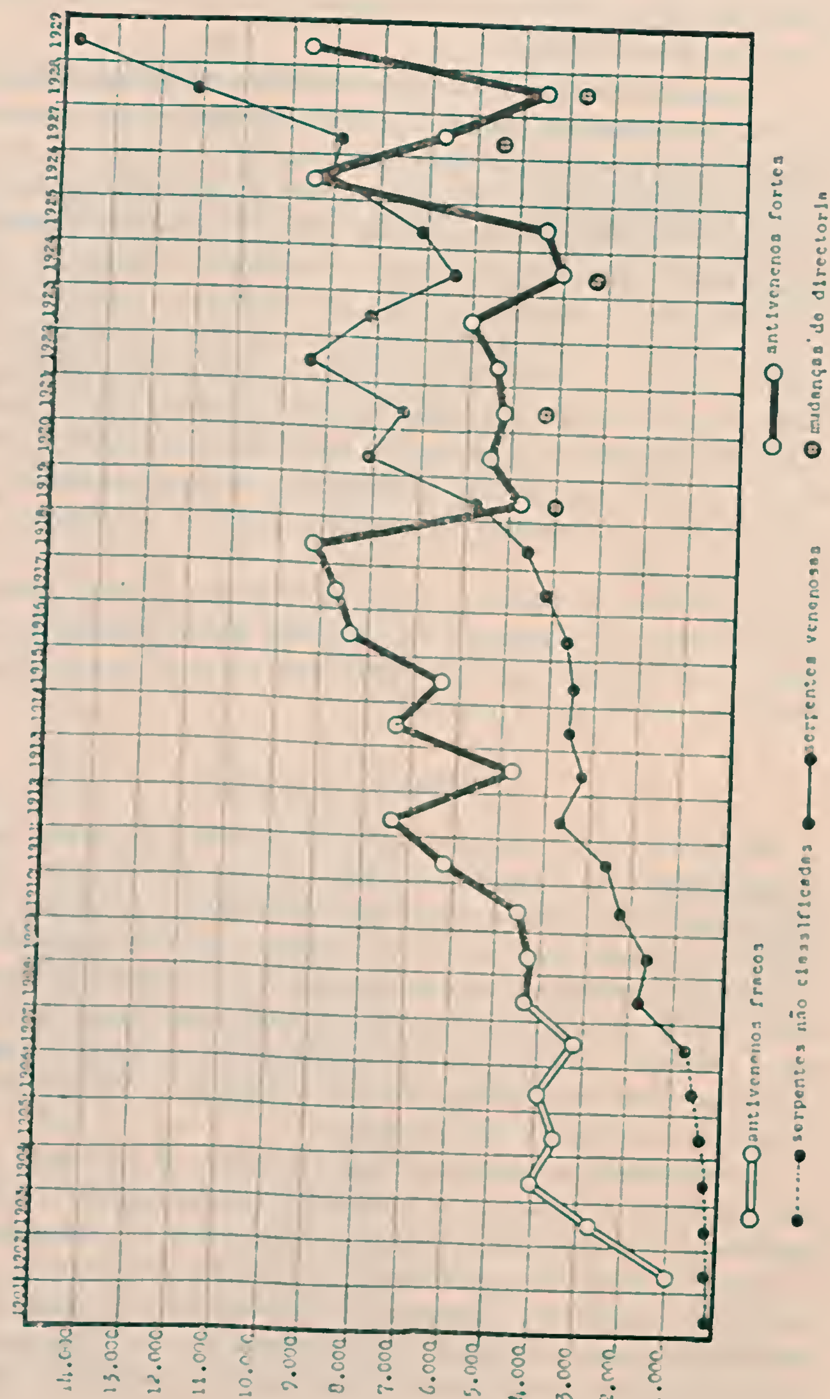
d) Producção de antivenenos

Effectivamente, o Instituto immuniza cavallos para o preparo dos varios typos de antivenenos especificos (sôros anti-peçonhentos), com o veneno obtido do grande numero de serpentes que recebe.

Feita a necessaria revisão na estatistica de producção de antivenenos e discriminadas especialmente as partidas de sôros fortes, isto é, cujo poder antitoxico é superior ou pelo menos igual á minima ha muitos annos estabelecida no Instituto (0,8 mgr. por cc. para o sôro anti-crotalico, 1,5 mgr. por cc. para o sôro anti-bothropico e $\frac{0,4}{1,0}$ por cc. para o anti-ophidico), das partidas de sôros fracos, isto é, aquelles cujo poder antitoxico estava aquem dessa minima ou correspondiam a lotes preparados nos primeiros annos, quando eram distribuidos ainda em empolas de 20 cc. e sua technica de preparo e doseamento não estava ainda definitivamente estabelecida, obtem-se um novo graphico em que se vê essa producção acompanhar de perto a entrada de serpentes venenosas.

QUADRO V

Relação entre a entrada de serpentes venenosas e a producção de antivenenos



Os dados constantes dessa comparação podem ser claramente representados em forma de curva, conforme se vê no quadro V. A analyse deste quadro revela os seguintes factos principaes:

1.º A curva de entrada de serpentes venenosas reproduz quasi exactamente a que está representada no quadro II, relativo ao numero total de serpentes, de quaesquer typos, recebidas pelo Butantan desde 1901.

2.º A producção de antivenenos foi relativa e constantemente maior do que a entrada de serpentes, isto até o anno de 1918, quando aquella producção começou a decrescer. Este facto está ligado principalmente á reducção volumetrica que a producção de antivenenos soffreu em resultado da concentração mais ou menos systematica das partidas de plasma e cujo inicio se verificou por volta de 1917. Reduzido o volume desses plasmas em consequencia da refinação, era natural que sua producção total ficasse reduzida em relação á do periodo anterior.

3.º A diminuição da producção de antivenenos nos annos de 1919, 1921, 1924, 1927 e 1928, correspondeu exactamente a alterações verificadas na orientação do Instituto, em resultado das constantes mudanças de directoria observadas entre 1919 e 1928.

4.º A reacção de augmento da producção surgiu em 1926, quando os antivenenos, apezar de concentrados por sua maior parte, ultrapassaram em quantidade a cifra verificada em 1918. Devo dizer que essa reacção observada em 1926 foi reproduzida no corrente anno.

c) Mortalidade por ophidismo

Naturalmente que é impossivel saber-se em nosso país quantas pessoas morrem annualmente em resultado de picada por serpentes venenosas. Os calculos que se fazem a esse respeito representam provavelmente apenas uma vaga approximação da verdade, para mais ou para menos. Em seus primitivos trabalhos, Vital Brazil (1) achava que se poderia acceitar para cada Estado do Brasil a media annual de 200 obitos ligados ao ophidismo; mais tarde, baseado nos dados estatisticos referentes ao Estado de São Paulo, avaliou em 4.800 o numero global provavel de mortes por ophidismo em todo o Brasil, annualmente, sobre um total de cerca de 19.200 accidentes ophidicos.

Compulsando-se as estatisticas vitaes do Estado de São Paulo obtêm-se os dados constantes do quadro VI e referentes á mortalidade geral e a por animaes peçonhentos, cuja maioria é naturalmente representada por serpentes.

Por esse quadro se verifica que o coefficiente por 1.000, de mortalidade por animaes peçonhentos, se manteve em redor de 2,6 a 2,0 desde que todos os municipios do Estado começaram a enviar estatisticas (isto é, em 1906) até 1912, e que, depois dessa época, decresceu rapidamente, mantendo-se nos ultimos 6 annos em torno de 0,8 a 1,1.

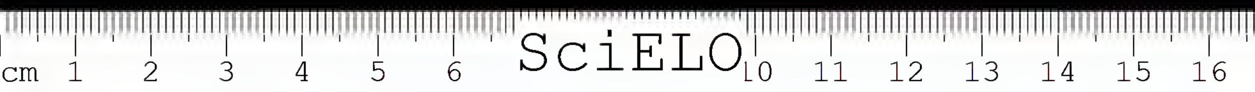
QUADRO VI

Relação entre a mortalidade geral e a por picada de animaes peçonhentos no Estado de São Paulo

ANNO	Mortalidade geral	Mortalidade por peçonhas	Coefficiente por 1.000 obitos	NUMERO DE MUNICIPIOS QUE ENVIARAM ESTATISTICAS
1902	50.693	54	1,0	128 municipios (17 incompletos)
1903	41.091	89	2.1	120 "
1904	48.041	123	2.5	154 "
1905	57.507	148	2.5	171 "
1906	64.434	156	2.4	172 " (completos)
1907	59.059	155	2.6	172 " "
1908	59.874	143	2.3	172 " "
1909	59.515	149	2.5	172 " "
1910	62.401	126	2,0	172 " "
1911	64.324	146	2,2	173 " "
1912	71.611	150	2.0	174 " "
1913	69.104	127	1,9	175 " "
1914	68.693	97	1.4	179 " "
1915	66.302	80	1,2	181 " "
1916	70.938	74	1,0	185 " "
1917	76.680	71	0,9	187 " (1 incompleto)
1918	89.545	84	0,9	194 " (2 incompletos)
1919	81.938	111	1,3	199 " (1 incompleto)
1920	80.777	82	1,0	204 " (completos)
1921	93.434	78	0,8	204 " "
1922	85.450	115	1,3	211 " "
1923	91.986	75	0.8	216 " "
1924	96.024	84	0,9	219 " "
1925	92.172	82	0,9	229 " "
1926	92.147	84	0,9	241 " "
1927	95.767	80	0,8	246 " "
1928	102.029	101	0,9	251 " "
1929	101.834	122	1,1	259 " "

Tendo-se em vista a imperfeição das estatisticas vitaes ha cerca de 20 ou 25 annos, devido ás difficuldades de communicação então existentes e o pouco interesse revelado no caso pelas municipalidades naquelle tempo, pode-se calcular em cerca de 2,5 a 3 por 1.000 o primitivo coefficiente de mortalidade por picada de animaes peçonhentos, no Estado de S. Paulo, chegando-se á conclusão de que a campanha do Instituto Butantan tem conseguido reduzir essa cifra a, pelo menos, 1/3 do original. Em outros termos, pode-se dizer que, só nesse terreno, o Instituto tem contribuido para a economia local com cerca de Rs. 4.000:000$000 annuaes, calculando-se em Rs. 20:000$000 o valor medio actual de cada pessoa salva.

Aliás o Instituto Butantan possue um meio indirecto, embora tambem apenas approximativo, de avaliar os accidentes ophidicos propriamente ditos e a mortalidade delles decorrente, graças aos boletins que envia conjunctamente com as empolas de sôro para serem preenchidos pelas pessoas que recorrem ao tratamento especifico. Esses boletins obedecem ao typo constante do modelo que aqui apresento:



INSTITUTO BUTANTAN

CAIXA POSTAL 65 — S. PAULO

BOLETIM PARA OBSERVAÇÃO DE ACCIDENTE OPHIDICO

Tratamento feito pelo Sr. ______________________

Residente em ______________________ *no Estado de* ______________

Na pessoa de ______________________ *de* ____ *annos de edade.*

Ponto do corpo em que foi mordido: ______________________

____

1.º — *Qual o nome da cobra que mordeu?*

R. — ______________________

2.º — *Qual o numero de horas decorridas entre a hora em que se deu o accidente e a da 1.ª injecção?*

R. — ______________________

3.º — *Qual a qualidade do soro empregado? Quantas empolas?*

R. — ______________________

4.º — *Qual o resultado do tratamento? Cura?*

R. — ______________________

5.º — *Houve cegueira?*

R. — ______________________

6.º — *Houve hemorrhagia?*

R. — ______________________

7.º — *Houve paralysia?*

R. — ______________________

8.º — *Houve inchação no logar mordido?*

R. — ______________________

9.º — *Em que data occorreu o accidente?*

R. — ______________ *de* ______________ *de 19*

Observações: ______________________

____

____

N. B. — No caso de ter sido applicado em animal, façam-se as alterações necessarias.

O Director do Instituto, desejando colher elementos para a organização da estatistica dos accidentes ophidicos tratados pelo soro, pede instantemente ás pessoas que tiverem tido a opportunidade de applicar esse recurso therapeutico, o obsequio de encherem este boletim, devolvendo-o em seguida a este estabelecimento, acompanhado de todos os esclarecimentos que julgarem util accrescentar aos que constam das perguntas acima.

QUADRO VII

Accidentes ophidicos tratados por antivenenos de 1902 a 1929, segundo boletins recebidos pelo Instituto Butantan

ANNO	CASOS CURADOS					CASOS FATAES				
	Homens	Mulheres	Crianças	Animaes	TOTAL	Homens	Mulheres	Crianças	Animaes	TOTAL
1902	11	1	4	—	16	—	—	—	—	—
1903	14	6	3	—	23	—	—	—	—	—
1904	8	1	7	—	16	—	—	—	—	—
1905	11	—	4	3	18	—	—	—	—	—
1906	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1907	29	9	11	5	54	1	1	1	—	3
1908	55	11	21	12	99	3	—	1	—	4
1909	57	2	21	3	83	—	1	3	4	8
1910	68	9	30	28	135	—	1	—	3	4
1911	102	11	31	18	162	3	1	1	2	7
1912	95	16	29	18	158	—	—	—	3	3
1913	55	11	26	24	116	1	—	1	3	5
1914	98	15	31	25	169	—	—	1	2	3
1915	81	21	27	28	157	4	—	—	2	6
1916	103	11	32	28	174	4	1	1	1	7
1917	97	19	30	18	164	1	—	—	3	4
1918	87	23	32	19	161	3	—	1	8	12
1919	76	8	22	25	131	4	—	1	3	8
1920	56	17	23	21	117	1	1	—	2	4
1921	54	10	10	14	88	1	—	2	2	5
1922	74	27	40	22	163	3	—	3	1	7
1923	66	17	19	25	127	—	—	—	—	—
1924	48	15	25	21	109	2	1	—	2	5
1925	86	13	31	15	145	5	2	1	1	9
1926	115	36	59	29	239	1	—	2	5	8
1927	91	22	36	18	167	3	1	3	2	9
1928	112	22	39	38	211	4	—	1	1	6
1929	123	26	51	57	257	2	—	3	4	9
	1.872	385	688	514	3.459	46	10	26	54	136

A revisão que acabo de fazer dos boletins recebidos pelo Instituto desde 1902, sobre accidentes ophidicos tratados por antivenenos especificos, forneceu-me elementos para organizar o quadro VII, cuja analyse revela os seguintes factos referentes aos casos que terminaram pela morte, apezar do tratamento especifico:

1.º Os homens contribuem com mais de metade dos accidentes curados (cerca de 54 %); as mulheres, com cerca de 11 %; as crianças, com 20 % e os animaes, com 15 %.

2.º A mortalidade relativa entre os casos tratados é mais alta entre os animaes (cerca de 40 %) do que em qualquer dos outros 3 grupos de victimas. Os homens, as mulheres e as crianças contribuem, respectivamente, com cerca de 34 %, 7 % e 19 % para o total das fatalidades, embora possa haver, neste ponto, engano quanto á distincção das pessoas offendidas em crianças e adultos, porquanto algumas mulheres, nem mesmo sob a influencia da peçonha ophidica, deixam de diminuir a edade.

3.º O envenenamento ophidico é sempre muito grave nas crianças e especialmente nos pequenos animaes, o que é, sem duvida, devido á maior concentração sob que o veneno das serpentes actua sobre taes organismos de pequeno peso. Na verdade, verifica-se, pela analyse dos 54 casos de animaes mortos em resultado de picadas e apezar do tratamento, que só os cães concorreram com 20 ou seja 36 % do obituario desse grupo.

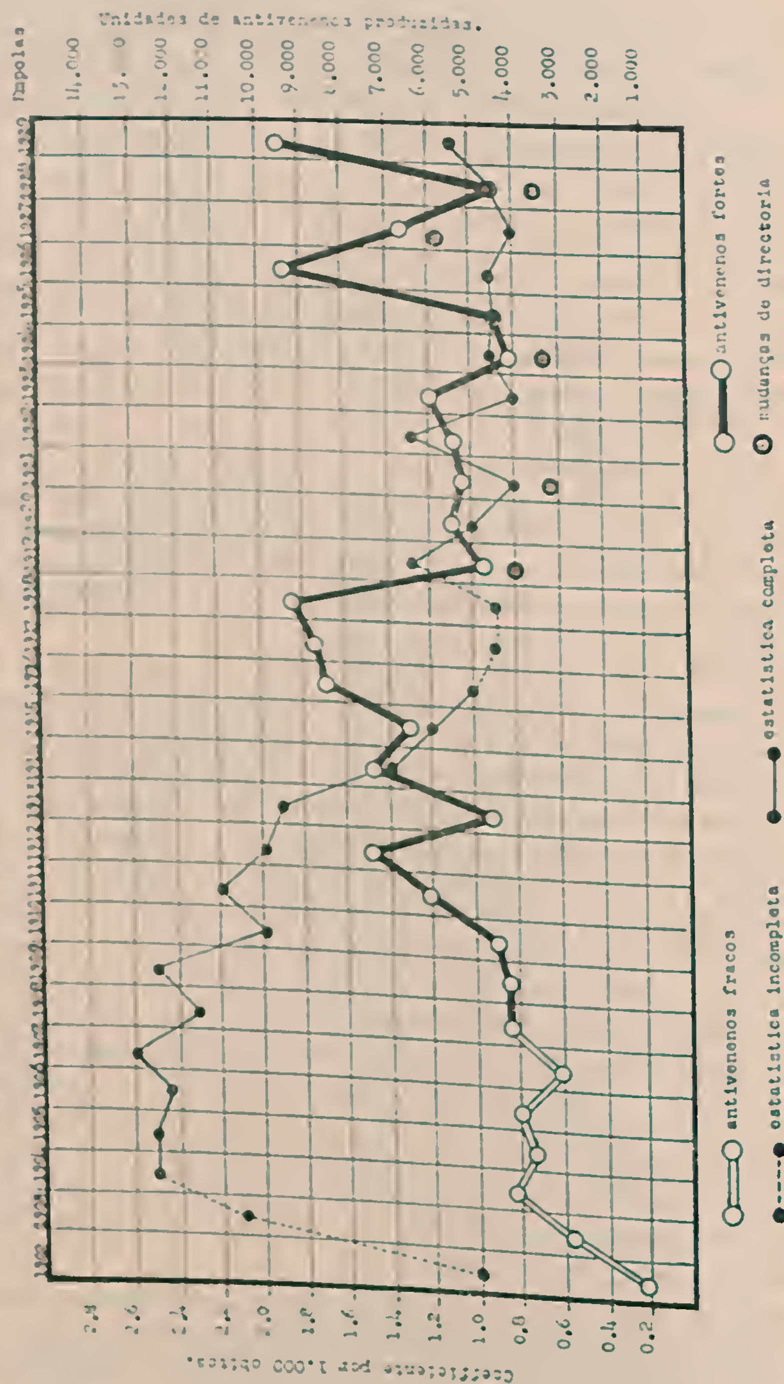
Já desde 1919 eu venho verificando, assim em experiencias de laboratorio, como pela observação de pacientes, que as doses até ha pouco recommendadas pelo Instituto Butantan para o tratamento de accidentes ophidicos em crianças e em certos animaes de pequeno tamanho, eram insufficientes. Por isso mesmo é que nas novas instrucções a serem expedidas pelo Instituto sobre o methodo de tratamento e as doses a empregar em taes casos, aconselhamos, conforme se lê abaixo, *a repetição das injecções em intervallos de duas horas, sempre que o accidente seja grave, e quantidades de antiveneno tanto maiores quanto menores e mais jovens forem as victimas. Assim, nas crianças e nos cães é necessario que se injecte pelo menos uma dose inicial de 40 a 60 cc., desde que, pelo quadro symptomatico, se verifique a gravidade dos casos. Alem disto, é aconselhavel, segundo observações que venho fazendo ha algum tempo, injectar-se em torno do ponto offendido pelo menos uma parte da dose do sôro indicada, nos casos de picada pela Jararaca e outras serpentes do mesmo genero* (BOTHROPS), *cuja acção necrosante sobre os tecidos é bem conhecida.*

Só por este meio e pela suppressão do emprego do alcool, do kerozene e de outras "medicações de urgencia" que taes, se poderá fazer baixar ainda o coefficiente de mortalidade por ophidismo.

Alem do menor peso, concorre nas crianças e nos pequenos animaes, para o aggravamento do accidente e para a difficuldade da cura, o facto de em taes casos não ser geralmente possivel, sinão pela marcha dos symptomas, reconhecer-se a especie de ophidio que causou o envenenamento, donde decorre quasi

QUADRO VIII

Relação entre a mortalidade por ophidismo e a producção de antivenenos



QUADRO IX

Accidentes ophidicos tratados por antivenenos de 1902-1929, conforme boletins recebidos pelo Instituto Butantan e classificados por victimas e por especies mordedoras

ESPECIES MORDEDORAS	CASOS			HOMENS				MULHERES				CRIANÇAS				ANIMAES			
	total	curados	fataes	curas	%	mortes	%	curas	%	mortes	%	curas	%	mortes	%	curas	%	mortes	%
Crotalus terrificus (Laur.)	481	423	58	257	90,4	27	9,5	41	91,1	4	8,8	72	80,8	17	19,1	53	84,1	10	15,8
Lachesis muta (L.)	10	10	—	9	100,0	—	—	1	100,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bothrops jararaca (Wied)	1.466	1.455	11	833	99,4	5	0,5	188	98,9	2	1,0	315	99,0	3	0,9	119	99,1	1	0,8
Bothrops jararacussu Lacerda	422	413	9	267	98,1	5	1,8	36	100,0	—	—	74	97,3	2	2,6	36	94,7	2	5,2
Bothrops alternata D. & B.	249	240	9	133	97,7	3	2,2	15	100,0	—	—	55	98,2	1	1,7	37	88,0	5	11,9
Bothrops neuwiedii Wagler	133	132	1	85	100,0	—	—	13	100,0	—	—	29	100,0	—	—	5	83,3	1(*)	16,6
Bothrops atrox (L.)	40	39	1	28	96,5	1	3,4	4	100,0	—	—	4	100,0	—	—	3	100,0	—	—
Bothrops cotiara (Gomes)	29	29	—	16	100,0	—	—	4	100,0	—	—	7	100,0	—	—	2	100,0	—	—
Micrurus spp. (coraes venenosas)	9	9	—	5	100,0	—	—	4	100,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ignoradas	756	709	47	239	97,9	5	2,0	73	94,8	4	5,1	137	97,8	3	2,1	260	88,1	35	11,8
	3.595	3.459 96,2 %	136 3,7 %	1.872	97,6	46	2,3	379	97,4	10	2,5	693	96,3	26	3,6	515	90,5	54	9,4

(*) Animal picado 2 vezes no intervallo de 4 dias e tratado tardiamente.

sempre a applicação tardia do remedio. Alem disso, acontece que não são poucas as vezes em que taes accidentes são erroneamente tratados por sôros não especificos. Assim sendo, não é de estranhar que, a despeito de todos os esforços empregados pelo Instituto para vencer a ignorancia do povo e melhor distribuir as empolas de antiveneno, a porcentagem de mortalidade de casos tratados pareça ter chegado a um limite (entre 3 % e 5 %) de que talvez difficilmente venha a baixar.

Todavia, o resultado favoravel da applicação dos antivenenos no tratamento das picadas de serpentes transparece facilmente dos quadros apresentados, porquanto, apezar de a mortalidade geral do Estado de São Paulo estar augmentando, embora não siga parallelamente com o rapido crescimento da população, a mortalidade por ophidismo (incluida na rubrica "Picadas de animaes peçonhentos") tem decrescido na ordem quasi inversa. Esse resultado é, por sem duvida, devido ao emprego dos antivenenos cuja producção é em grande parte enviada para a zona rural do Brasil, em permuta pelas serpentes que, em numero crescente, o Instituto dali recebe.

No quadro VIII pode-se ver a relação existente entre a mortalidade por ophidismo e a producção de antivenenos, á luz das estatisticas do Instituto Butantan.

Mais interessantes ainda são os ensinamentos que decorrem do estudo comparativo dos accidentes ophidicos segundo as especies de serpentes e a qualidade de suas victimas. Esses dados encontram-se resumidos no quadro IX, cuja analyse mostra varios factos dignos de maiores commentarios.

Assim é que delle resalta mais uma vez que, pelo menos para o sul do Brasil, a Jararaca é a especie que determina maior numero de accidentes. Isto é naturalmente devido ao facto de ser ella a especie mais abundante, alem de viver nos campos e frequentar logares abertos, facilmente accessiveis ao homem. Apezar disto, é bem provavel que, dada a ignorancia do nosso trabalhador rural, varios casos tenham sido attribuidos á Jararaca, quando na verdade a especie causadora do accidente haja sido outra qualquer, como a *B. neuwiedii*, a *B. atrox*, etc. No caso particular da *B. neuwiedii*, é possivel tambem que o numero de accidentes registado esteja alem da realidade, porquanto parece ter havido confusão, desde os primeiros trabalhos feitos em Butantan, no tocante á denominação vulgar desta especie, á qual se tem applicado a denominação "Jararaca de rabo branco", que o povo do interior costuma empregar em relação aos exemplares immaturos da *B. jararaca*.

Esta estatistica ainda mostra que a Cascavel apparece em segundo logar entre as serpentes devidamente identificadas como causadoras de accidentes. E' ella, na verdade, encontrada com alguma frequencia nas terras seccas e especialmente nos cafezaes e outras culturas, onde encontra numero sufficiente de roedores, de que se alimenta.

Logo em seguida surge a Jararacussú, nome que é ás vezes applicado, erroneamente, pelo povo, aos exemplares velhos da Jararaca e da Caissaca, de sorte que é possivel que, neste particular, a estatistica não seja bastante rigorosa. Esta especie frequenta os logares baixos ou alagadiços e apparece por vezes nas margens de rios e banhados, onde constitue seria ameaça aos pescadores e á criação em geral.

A Urutú concorre com menos de 7 % dos casos communicados, sendo geralmente considerada pelos lavradores como especie perigosissima, sobre cuja picada dizem "quando não mata, aleija". Effectivamente, a *B. alternata* é uma especie excessivamente irascivel que se costuma encontrar em attitude de defesa e prestes a picar. Sóe encontrar-se entre paus, sob pedras ou especialmente em buracos, habito que propicia a picada de cães de caça.

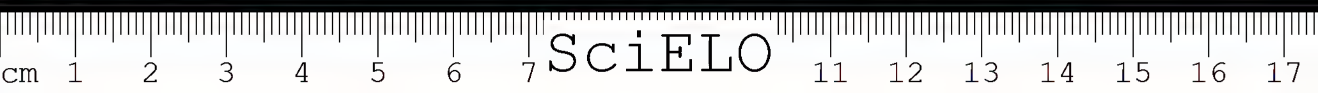
Depois da *B. neuwiedii* de que falei acima, vêm a Caissaca e a Cotiara, a primeira das quaes contribue com um numero diminuto de accidentes para a estatistica de Butantan, porque esta se refere mais particularmente á zona meridional do Brasil, onde a especie é rara. Já disse que fôra do norte e na região amazonica que estivessemos empreendendo a lucta contra o ophidismo e forçosamente a Caissaca tomaria o logar da Jararaca, especie que até agora não foi assignalada ao norte da Bahia e do planalto central do Brasil.

A *Lachesis muta*, a celebre Surucutinga ou Surucucú de fogo, tão temivel dos nossos caçadores e lenhadores, por seu tamanho e aggressividade, contribue com um coefficiente quasi negligivel para a estatistica. Isto é devido ao facto de esta serpente habitar logares ermos, especialmente mattas e florestas, e viver em buracos de tatús onde só é molestada pelos cães de caça e caçadores menos cautos. Naturalmente que, occorrendo em grande extensão da zona estrictamente tropical, a Surucutinga deve causar um numero muito maior de accidentes e muitos delles fataes, embora não communicados ao Instituto, nem talvez siquer conhecidos dos centros populosos. Tenho para mim que as nossas selvas guardam tambem o segredo do que se passa com as pessoas e animaes picados por essa cobra.

As Coraes, embora muito frequentes no sul do Brasil, apenas determinaram 9 accidentes communicados ao Instituto no periodo de 28 annos (1902-1929), o que vem demonstrar a raridade de sua picada. Devido a isto, o Instituto Butantan deixou, ha muitos annos, de preparar o antiveneno elapidico ("sôro anti-elapineo") que não teve procura por parte da população rural, e trata de desenvolver apenas a producção dos demais antivenenos, cuja necessidade está cabalmente demonstrada pelos proprios dados estatisticos que venho commentando.

f) Producção de veneno por especies

Alem da idade e tamanho da victima, influem na gravidade do envenenamento ophidico certos factores que dizem respeito, uns á propria victima, outros á serpente ou á especie causadora do accidente. Entre os primeiros se incluem a re-



gião do corpo attingida, a via de penetração do veneno, a condição ou estado do paciente. Assim é que o envenenamento é tanto mais grave quanto mais perto do tronco e, pois, dos centros vitaes é feita a picada; do mesmo modo a gravidade augmenta quando o veneno é inoculado directamente na circulação (o que felizmente parece dar-se rarissimamente) e quando a victima está com o estomago cheio, ou soffre de lesão cardiaca ou renal, ou então é mulher em adiantado estado de gravidez, pois, nestes casos, a eliminação do veneno é mais difficil.

Entre os segundos estão comprehendidos o tamanho da serpente causadora do accidente e a especie a que ella pertence. Assim é que, de um modo geral, se tem verificado que os exemplares adultos secretam maior quantidade de veneno do que os jovens e do que os já envelhecidos, embora seja verdade que, em certas especies, os individuos já completamente desenvolvidos é que secretam mais veneno. A variação por especie está ligada á toxicidez de cada veneno, a qual é mais accentuada na cascavel do que nas outras serpentes crotalideas brasileiras. Felizmente a cascavel é, de todas as especies communs, aquella que secreta menos veneno de cada vez, conforme se depara do seguinte quadro organizado segundo os dados publicados por Vital Brazil (1914) e no qual, ao lado da quantidade (volume) de veneno secretada pelas serpentes, se encontra o peso do mesmo depois de deseccamento no laboratorio:

ESPECIES	Volume em c. c	Peso em milligrs.
Crotalus terrificus . . .	0.1	33
Bothrops jararaca . . .	0.2	66
B. jararacussu	1.0	330
B. alternata	0.5	165
B. neuwiedii	0.1	33
B. atrox	0.3	99
B. cotiara	0.4	120

Por esse quadro tambem se verifica que, sendo extrahido de serpentes em condições mais ou menos normaes, o veneno perde cerca de 2/3 de seu peso ao ser deseccado, ou, em outros termos, a parte solida (parte activa) representa approximadamente 1/3 do total do veneno.

Este resultado, todavia, se modifica com a repetição das extracções de veneno dos mesmos exemplares, porquanto, então, não somente se reduz a media de producção por individuo (e especie, consequentemente), mas ainda o veneno fica menos concentrado, passando a parte solida a representar apenas 1/4 ou 1/5 do peso total do veneno, conforme se verifica pelos seguintes quadros, baseados em algumas dezenas de milhares de extracções dentre as registadas na Secção de Ophiologia do Instituto no periodo de 1912 a 1930:

Producção de veneno pelas especies mais communs do Brasil
(Veneno liquido)

	No. de extracções	Volume em c. c.	Media em c. c. por exemplar
Crotalus terrificus . . .	28.527	3.001	0,10
Bothrops jararaca . . .	43.823	4.193,3	0,09
B. jararacussu.	2.044	895,4	0,43
B. alternata.	2.514	588,6	0,23
B. neuwiedii	3.418	322,5	0,09
B. atrox	2.761	600,3	0,21
B. cotiara	968	124,25	0,13

Producção de veneno pelas especies mais communs do Brasil
(Veneno deseccado)

	No. de extracções	Volume em c. c.	Media em millgrs. por exemplar
Crotalus terrificus . . .	12.755	297,099	23 mgr.
Bothrops jararaca . . .	29.875	686,022	22 mgr.
B. jararacussu.	506	52,870	104 mgr.
B. alternata.	1.251	58,757	47 mgr.
B. neuwiedii	1.408	29,664	21 mgr.
B. atrox	1.012	48.544	47 mgr.
B. cotiara	1.228	33,352	27 mgr.

A analyse dos dados constantes destes quadros, alem de reforçar as informações, exaradas em paginas anteriores, sobre a grande toxicidade do veneno da cascavel, sobre a frequencia das picadas por esta especie e pela jararaca e sobre a gravidade do envenenamento causado pela jararacussú, urutú e jararaca pintada, vem justificar cabalmente a praxe adoptada pelo Instituto Butantan de não expor a consumo sinão antivenenos (sôros anti-peçonhentos) ophidicos de poder antitoxico relativamente elevado. Na verdade, diante dos elementos estatisticos representados neste trabalho, não se poderia justificar, no tratamento de accidentes ophidicos, o emprego de sôros cujo poder antitoxico fosse inferior aos seguintes valores: 8 millgrs. de veneno de cascavel por 10 cc., para o anti-crotalico; 15 millgrs. de veneno de jararaca por 10 cc., para o anti-bothropico; 4 millgrs. de veneno de cascavel X 10 millgrs. de veneno de jararaca por 10 cc., para o anti-ophidico.

g) Frequencia das picadas pelas regiões do corpo

Analysando-se os 3595 boletins de accidentes ophidicos, recebidos pelo Instituto Butantan no periodo de 1902 a 1929, os quaes dão uma idéa apenas approximada da frequencia das picadas entre nós, porque é sabido que a maioria das

pessoas chamadas a tratal-as, deixam, por esquecimento ou negligencia, de communical-as ao Instituto, pode-se ter, ainda assim, uma idéa da distribuição das picadas pelas varias regiões do corpo. Pondo-se á margem 569 casos de picadas assignaladas em animaes, observa-se, pela analyse dos restantes 3026 casos, todos humanos, que nelles as picadas se distribuiram do seguinte modo:

Casos humanos de picadas por serpentes venenosas, tratados por sôros especificos, segundo boletins recebidos pelo Instituto Butantan

Região offendida	Numero de casos	%	
Pé	1460	48.24	= 70.87 %
Perna	668	22.07	
Coxa	17	0.56	
Nadega	5	0.16	
Tronco	6	0.19	
Mão	496	16.39	= 17.57 %
Antebraço	19	0,62	
Braço	11	0.36	
Cabeça	2	0,06	
Labio	4	0.13	
Região não declarada	322	10.64	
Picadas complexas	16	0.52	

Pelo quadro acima se verifica que, no total das picadas humanas, communicadas ao Instituto até agora, os membros inferiores foram attingidos em cerca de 71 % dos casos; os membros superiores em cerca de 17 %; regiões não declaradas em cerca de 11 %, ficando o excedente 1 % repartido pelo resto do corpo. D'outro lado, desprezando-se, em relação aos membros, os casos de picada na coxa, antebraço e braço, chega-se á conclusão de que, á luz de nossas estatisticas, cerca de 70 % das picadas se passam no membro inferior, para baixo do joelho e que, pelo menos em 16 % das vezes, as mordidas attingem a mão.

Fazendo-se, porém, a devida abstracção dos casos referentes a picadas complexas e a regiões não declaradas e computando-se os restantes 2688 boletins, correspondentes a accidentes ophidicos registados com certo cuidado, obtêm-se resultados que provavelmente se approximam mais da verdade do que os acima assignalados. Assim é que, nestas condições, os accidentes dos membros inferiores passam a representar cerca de 79,79 % do total (ou 79,16 % para o pé e a perna, isto é, para baixo do joelho), enquanto os dos membros superiores se elevam a 19,56 % (ou 19,16 % só para a mão e o antebraço, isto é, para baixo do cotovello), ficando a fracção excedente para o resto do corpo (Fig. 20).

Um estudo mais particularizado de taes boletins mostra ainda o seguinte (Fig. 21):

1. *que o uso constante de botina evita cerca de 54 % das picadas, mas que a botina deve ser de couro e desprovida de elastico, pois, do contrario, a presa das serpentes pode attingir o pé, conforme já nos tem sido communicado;*

2. *que, alem da botina, as pessoas que trabalham ou andam em logares infestados pelos nossos ophidios venenosos, devem usar perneira de couro, pois, assim podem evitar que as pernas sejam attingidas em quasi 25 % das vezes;*

3. *que, de referencia ás picadas na mão, cuja porcentagem é de 18,45, as crianças e mulheres são relativamente muito mais sujeitas do que os homens e isto porque, de um lado, as crianças estão em contacto mais directo com o solo, por occasião de seus divertimentos ou trabalhos de roça e porque, de outro lado, as mulheres se entregam mais a miude ao serviço de fazer lenha e de catar café sobre a terra ou colher certos cereaes;*

4. que a urutú (*Bothrops alternata*) é a especie que relativamente produz maior numero de accidentes nas mãos, o que parece ser devido ao facto de ella viver nos logares em que as mulheres e as crianças se entregam ao labor agricola e especialmente nos cafezaes;

5. que, na maioria dos raros casos de picadas nas nadegas, o accidente occorre quando o paciente se acha de cocoras, a limpar covas de café;

6. finalmente, que, na quasi totalidade dos casos fataes, o tratamento pelos sôros especificos é feito tarde ou, com mais frequencia, em dose insufficiente.

No tocante ao ophidismo, não é exaggero affirmar que, se o exemplo do Butantan fructificasse, seus ensinamentos fossem sempre observados á risca pela população rural e a iniciativa de São Paulo fosse seguida pelos demais Estados da federação, o Brasil poderia, dentro de poucos annos, reduzir consideravelmente as perdas decorrentes da picada de nossas serpentes venenosas e as estatisticas sobre ophidismo passariam a ter uma percentagem de letalidade inferior a 3,7, indice constante do alludido quadro IX, em que estão computados accidentes quasi exclusivamente do centro-sul do Brasil.

A' luz da experiencia adquirida no decorrer de seus trabalhos sobre o ophidismo no Brasil, o Instituto Butantan aconselha actualmente o seguinte:

METHODO DE TRATAMENTO DAS PICADAS

a) Primeiros cuidados

O primeiro cuidado de tratamento dos accidentes ophidicos é transportar o offendido para logar onde possa receber os necessarios soccorros, devendo-se evitar nesse transporte, tanto quanto possivel, grandes abalos para o paciente. Em seguida, deve-se desapertar toda a roupa e collocar o offendido em uma cama ou maca, ou mesmo sobre o sólo, extendido e com a cabeça baixa.

Antes de mais nada, é de toda conveniencia verificar a especie de serpente causadora do accidente, pois esse conhecimento será de grande utilidade na escolha do especifico a empregar.

Se o paciente estiver muito abatido, pode-se dar-lhe a beber uma chicara de café quente.

b) **Symptomas de envenenamento ophidico**

As serpentes solenóglyphas do Brasil causam dois typos bem diversos de envenenamento: o crotalico e o bothropico, sem mencionar o lachetico (produzido pela surucutinga) que, conforme vimos acima, é muito raro.

Os principaes symptomas de envenenamento do typo crotalico são geralmente os seguintes:

Dor local quasi nulla; fraqueza progressiva e rapida; paresia ou paralysia das palpebras, com perturbações da visão até completa cegueira; impressão de pescoço quebrado, devido á paralysia dos musculos cervicaes; vomitos ou, ás vezes, diarrhéa e urinas sanguinolentas (hematuria); pulso fraco e capillar; algidez principalmente das extremidades; somnolencia profunda e, nos casos graves, morte por parada da respiração.

Os principaes symptomas de envenenamento do typo bothropico são em resumo os seguintes:

Dor intensa na região attingida; edema hemorrhagico ascendente, com formacão de bolhas (phlyctenas); engorgitamento ganglionar; hemorrhagia pelas mucosas, taes como as da bocca, ouvido e estomago, intestino, rim, etc. ou, nas mulheres, a do utero, acompanhada de suspensão das regras; destruição progressiva dos tecidos mais de perto affectados, com formação de eschara e, por vezes quando a picada attinge os membros, com perda dos segmentos (mão ou braço, pé ou perna), devido á gangrena que se installa.

c) **Medidas contra-indicadas**

1) Agitar o corpo, trabalhando, correndo ou gritando, pois do contrario se estimularia a circulação e se facilitaria a absorpção do veneno.

2) Tomar qualquer bebida alcoolica, pelo mesmo motivo.

3) Beber kerozene que, alem de altamente toxico para o figado e o sangue, pode tornar inefficaz o emprego do sôro especifico. Em grandes doses o kerozene é talvez mais nocivo do que os proprios venenos.

4) Ingerir infusos de alho e de plantas medicinaes, ou outros remedios caseiros, os quaes não têm acção alguma sobre os venenos.

5) Injectar permanganato de potassio ou outra qualquer substancia chimica, pois seria perder tempo.

d) **Escolha do sôro a empregar**

Deve-se empregar o sôro anti-crotalico nos accidentes de typo crotalico, isto é, determinado pela cascavel; o sôro anti-bothropico polyvalente, nos envenenamentos de typo bothropico, isto é, produzidos pela jararaca, caissaca, jararacussú, urutú, cotiara, etc.; o sôro anti-bothropico monovalente, nas picadas pela jararaca.

devendo-se reservar o sôro mixto ou polyvalente, sôro anti-ophidico, para os casos de não se reconhecer a serpente que mordeu.

e) Opportunidade do tratamento

A rapidez com que se recorre ao tratamento especifico tem grande influencia sobre o seu resultado e sobre a quantidade de sôro a empregar: *quanto mais cedo for injectado o sôro, tanto maior a probabilidade de cura e menor a dose necessaria para neutralizar o veneno inoculado.*

Em via de regra, mesmo nos casos graves, a primeira injecção poderá ser coroada de exito se for feita em dose sufficiente e dentro das duas primeiras horas após o accidente.

f) Doses indicadas

Nos casos de envenenamento de extrema gravidade, ou naquelles em que os symptomas se apresentam rapidamente, conforme succede nas crianças e nos pequenos animaes, devem-se injectar logo 40 ou 60 cc. de sôro; nos de media intensidade, metade destas doses (20 a 30 cc.); nos benignos, cerca de um terço (10 a 20 cc.).

Desde que cada empola contém 10 cc. de sôro, é necessario injectar o conteudo de 4 a 6 empolas, nos casos muito graves; 2 a 3 empolas, nos casos medios; 1 a 2 empolas, nos casos benignos.

Para as crianças e os pequenos animaes (cães e gatos, por exemplo), a dose de sôro deve ser maior de que para os adultos e os grandes animaes: a quantidade de sôro a injectar é inversamente proporcional ao peso do paciente.

g) Local da injecção

Possuindo o sôro effeito geral, a injecção pode ser feita por via sub-cutanea (hypodermica) em qualquer parte do corpo, devendo-se, entretanto, preferir região de pelle distensivel e pouco movel, como as costas, no intervallo das espaduas, ou os lados do ventre (flancos). Nos casos de envenenamento do typo bothropico é indicado tambem injectar-se uma parte da dose em redor do ponto picado, pois assim se circunscreve mais facilmente a destruição dos tecidos.

Nos casos graves e nas crianças e pequenos animaes, a injecção deve ser feita por via venosa ou peritoneal, desde que o calibre das veias seja diminuto. Afim de facilitar-se a eliminação do veneno e a reacção do doente, é necessario que, nos casos graves, alem do sôro ou de mistura com elle, se injecte agua physiologica com adrenalina (100 a 250 cc. de agua physiologica para 1 cc. de soluto de chlorhydrato de adrenalina a 1:1000). Nos casos de extrema gravidade ou nos que se apresentam com tendencia a collapso, é bom fazer tambem injecções de cafeina e estrychnina.

h) Escolha e preparo da seringa

Qualquer seringa grande e esterilizavel pode servir para a injecção dos sôros anti-peçonhentos.

Antes de se encher com o sôro, a seringa deve ser fervida conjunctamente com as agulhas. Para isso, collocam-se seringa e agulhas em uma pequena vasilha com agua em quantidade sufficiente para as cobrir completamente e fervem-se durante 5 a 10 minutos pelo menos. Vasa-se depois cuidadosamente parte da agua, deixando-se esfriar um pouco, antes de retirar a seringa. Esta não deve ser posta na agua já a ferver, porque pode partir, nem deve ser cheia quando ainda quente, porque, alem de ficar sujeita a quebrar, pode coagular o sôro.

i) Modo de encher a seringa

Para se transvasar o sôro, basta quebrar-se a extremidade afilada da empola e aspirar-se o conteudo por meio da seringa, conforme indica a figura 22.

j) Preparo da região

Escolhido o ponto a ser injectado, nas costas ou no ventre, lava-se cuidadosamente com agua e sabão e um pouco de antiseptico ou, na falta deste, mesmo com aguardente.

k) Modo de injectar o sôro

Preparado o ponto onde se vae fazer a injecção, trata-se de levantar, com a mão esquerda, a pelle, de modo a formar uma dobra ou cone, em cuja base se implanta uma das agulhas que acompanham a seringa (e que devem tambem ter sido esterilizadas), depois de retirado o pequeno fio metallico que lhe garante o funccionamento.

A agulha deve atravessar completamente a pelle (fig. 24), o que se verifica pela impressão que dá, de estar já com a ponta livre e dentro do tecido sub-cutaneo. Retiram-se então as bolhas de ar que porventura tenham ficado no interior da seringa, a qual então se liga á agulha implantada, injectando-se o sôro por um movimento de propulsão lento do embolo.

Se a seringa não tem a capacidade sufficiente para injectar de uma só vez toda a dose do sôro, deve-se, ao terminar a injecção da primeira quantidade separar a seringa da agulha e conservar esta implantada para evitar nova picada, inteiramente desnecessaria. Separada a seringa, trata-se de adaptar a ella a outra agulha esterilizada e proceder ao seu enchimento com nova quantidade de sôro, findo o que se passa a ligar á agulha já implantada, e assim successivamente.

l) **Cuidado com a seringa**

Depois de occupada, a seringa deve ser cuidadosamente lavada em agua, afim de serem removidos os traços de sôro porventura depositados em suas paredes, os quaes, pelo desseccamento, poderiam inutilizal-a completamente.

m) **Cuidados com o paciente**

Terminada a injecção, o paciente deve ser deixado na cama, no mais completo repouso, evitando-se qualquer causa de excitação.

Se a dose injectada é sufficiente e feita em tempo opportuno, as melhoras apresentam-se dentro de 3 a 6 horas. Se, porém, não for sufficiente, nem administrada bastante cedo, é necessario repetir-se a injecção cada 3 ou 6 horas até que se complete a dose necessaria á cura do caso.

Nos accidentes determinados pela cascavel acontece ás vezes que os phenomenos de intoxicação, depois de cederem apparentemente sob a influencia do tratamento, a ponto de darem ao paciente a impressão de cura completa, sobrevêm novamente, com certa intensidade e podem determinar a morte, caso não se faça logo nova injecção de sôro. E', pois, necessario, nos envenenamentos de typo crotalico, prolongar a observação por 3 semanas no minimo, ou então administrar, logo no começo, uma grande dose de sôro.

Enquanto estiver sob a influencia da intoxicação, a pessoa picada deve ser mantida em dieta liquida, constituida por leite, caldos, café, chá.

Do segundo para o terceiro dia, caso já tenha melhorado, o paciente deve tomar um purgativo salino brando, como sulfato de sodio ou citrato de magnesio.

n) **Instrucções sobre os sôros**

Embora os antivenenos entregues ao consumo pelo Instituto Butantan sejam geralmente concentrados, é frequente formar-se um pequeno precipitado que se deposita sobre a parede ou fundo das empolas. Esse precipitado não indica alteração do producto e representa a parte que não possue effeito therapeutico, de sorte que é preferivel não agitar as empolas antes de ser extravasado o seu conteudo.

Conservados em empolas intactas, ao abrigo da luz e em logar fresco, os sôros, mantêm suas propriedades curativas por muitos annos, tendo-se verificado no Instituto que, mesmo depois de 12 annos, ainda podem ser empregados. Por esse motivo é que não se acceitam em devolução os antivenenos entregues ao consumo publico.

O OPHIDISMO NA AMERICA DO NORTE E CENTRAL

Até o anno de 1925 nada se havia feito em materia de prophylaxia contra o ophidismo na America do Norte, nem tão pouco na America Central. De estatisticas a unica que até então se havia organizado fôra a de P. Willson (2), publicada já ha muitos annos e baseada no estudo de 740 casos de picadas de que havia noticia na literatura medica norte-americana. Esse trabalho quasi nenhum facto novo trouxe á luz, por se ter baseado inteiramente em casos pregressos e por não haver o seu auctor travado conhecimento directo com a questão.

a) Accidentes ophidicos

Nos Estados Unidos, o problema ophidico, que já existia antes da guerra mundial, aggravou-se enormemente em consequencia della, em virtude de haver o governo norte-americano iniciado forte campanha junto aos agricultores do sul e do oeste para que intensificassem as suas culturas, afim de proverem ao abastecimento, assim das tropas enviadas para a Europa, como da propria população do país, tornando-o independente da producção estrangeira, permittindo-lhe ficar, como se diz ali, "self-sufficient". Em resultado disto, as serpentes, que até então habitavam principalmente os desertos do sudoeste ou as zonas baixas do sudeste e do centro, começaram a invadir as plantações em busca de alimento mais facil e abundante, constituido de roedores. Logo depois, em consequencia do adensamento da população rural, começou a augmentar o numero dos casos de picada. Outro factor que tem contribuido para a importancia do problema foi a existencia de inumeros campos de concentração do exercito na região do Rio Grande, por toda a fronteira com o Mexico, de sorte que até os soldados têm contribuido tambem com o seu quinhão para a picada dos ophidios.

Durante os trabalhos que realizei na America do Norte, tive ensejo de viajar extensamente pelos Estados Unidos e pela America Central e procurei colher dados sobre o ophidismo, directamente, dos hospitaes, das sociedades medicas, dos serviços de estatistica vital dos varios Estados e das associações recreativas e de vida ao ar livre. Em relação á America Central, bem pouco pude apurar com exactidão sobre a importancia do ophidismo e isto devido ao grande atrazo em que permanece aquella parte do globo, podendo, porém, dizer que, com o inicio dos serviços ali e com a installação de um serpentario e estação experimental em Honduras, os casos de picada têm apparecido em numero sempre crescente, graças sobretudo ao interesse tomado na questão pelas companhias interessadas no desenvolvimento agricola daquella região e entre as quaes merece destaque especial a United Fruit Co.

Nos Estados Unidos, já isto não aconteceu, porquanto, em resultado de meus estudos, comecei a publicar desde 1927 estatisticas sobre o numero approximado de accidentes ophidicos ali occorridos e sobre a mortalidade delles resultante.

A respeito pode-se dizer, em resumo, que naquelle país o numero de accidentes ophidicos deve orçar por mais de 3.000 casos annualmente, com uma mortalidade que varia de accordo com as diversas zonas. Assim é que a letalidade sóbe apenas a 10 % no nordeste, no centro-oeste e no noroeste, ao passo que attinge 25 % no sudeste e 35 % no sudoeste, especialmente no Texas e no Novo Mexico. Esta variação da mortalidade é devida á diversidade de especies de ophidios causadoras de accidentes. Effectivamente, occorrem lá especies de tamanhos os mais differentes, desde a diminuta Cascavel de Willard (*Crotalus willardi*) que apenas alcança 2 palmos de comprimento, até a descommunal Cascavel da Florida que chega a attingir 2 metros e 70 cm.. Ha ainda a considerar no caso a quantidade de veneno secretado pelas varias especies e o seu relativo valor toxico.

Conforme mostrei em trabalhos ali publicados (3), só no Texas pudemos obter dados sobre 150 casos de picadas por serpentes venenosas, em resultado da actividade desenvolvida durante o primeiro anno de nossa campanha, isto é, de julho de 1926 a junho de 1927. Por esses dados se verifica que para mais de 50 % dos casos observados naquelle Estado provinham do districto de Santo Antonio (onde o Antivenin Institute of America, por mim fundado, mantém a sua estação ou laboratorio mais efficiente) e dos condados vizinhos, situados na região centro-meridional do Texas, o que vem mostrar que, com o desenvolvimento do serviço e com a disseminação das noticias sobre a actividade exercida pelo laboratorio local, o numero de accidentes communicados pelo menos duplicará futuramente. Não será de admirar que, em breve, se venha a ter noticia de uns 300 casos de ophidismo registados annualmente só no Estado do Texas, ultrapassando-se, assim, as cifras observadas no Estado de São Paulo.

As conclusões geraes do trabalho que então publiquei a respeito foram as seguintes:

1. Casos de picadas por serpentes occorrem em todos os pontos do Texas, nos districtos aridos assim como nos campos cultivados, dentro de mattas como na proximidade de corregos e pantanos, nos trechos incultos como dentro das cidades e até no interior das casas.

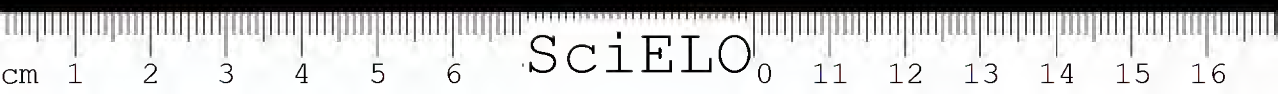
2. A cascavel concorre com a grande maioria das picadas.

3. A população do Estado parece não estar ainda acostumada a usar sapatos nem tão pouco perneiras e, por isso, as extremidades inferiores são attingidas pela maioria das picadas.

4. Picadas das extremidades superiores são sobretudo frequentes em crianças.

b) Serpentes solenoglyphas norte-americanas

Segundo a revisão que fiz dos ophidios solenoglyphos norte-americanos (4), as Crotalideas estão nos Estados Unidos representadas pelas duas subfamilias Lachesineas e Crotalineas e por tres generos, subdivididos em 15 especies a saber:



I. Genero *Agkistrodon* Beauvois:

1. *A. mokasen* Beauvois

Nome vulgar: Copperhead.

2. *A. piscivorus* (Lacépède)

Nome vulgar: Cotton-mouth Moccasin.

II. Genero *Sistrurus* Garman:

3. *S. catenatus* (Rafinesque) e suas raças.

Nome vulgar: Massasauga.

4. *S. miliarius* (Linneu)

Nome vulgar: Pygmy rattler.

III. Genero *Crotalus* Linneu:

5. *C. adamanteus* Beauvois

Nome vulgar: Eastern diamond-back rattler.

6. *C. atrox* Baird & Girard

Nome vulgar: Western diamond-back rattler.

7. *C. cerastes* Hallowell

Nome vulgar: Sidewinder.

8. *C. confluentus* Say e suas raças.

Nome vulgar: Prairie rattler.

9. *C. exsul* Garman

Nome vulgar: Red rattler.

10. *C. horridus* Linneu

Nome vulgar: Timber rattler.

11. *C. lepidus* (Kennicott)

Nome vulgar: Green rattler.

12. *C. molossus* Baird & Girard

Nome vulgar: Black-tail rattler.

13. *C. tigris* Kennicott

Nome vulgar: Tiger rattler.

14. *C. triseriatus* (Wagler)

Nome vulgar: Spotted rattler.

15. *C. willardi* Meek

Nome vulgar: Willard's rattler.

c) Producção de venenos por especies

De accordo com os estudos por mim feitos no laboratorio central do Anti-venin Institute of America, as Crotalideas norte-americanas secretam maior quantidade de veneno do que as brasileiras, embora, esta vantagem seja compensada pela menor toxicidade dessa secreção naquellas serpentes. Comparando os dados obtidos ali, no decurso de meus trabalhos, verifiquei que a parte solida dos venenos americanos representam de 1/3 a 1/4 do peso total, conforme se deprehende do quadro C.

QUADRO C

Quantidade media do veneno secretada pelas Crotalideas nearcticas

	Especimes jovens		Especimes adultos		Especimes velhos		Especimes excepcionaes	
	Liquido c. c.	Secco grs.	Liquido c. c.	Secco grs.	Liquido c. c.	Secco grs.	Liquido c. c.	Secco grs.
Agkistrodon mokasen	0.14	0.040	0.18	0.050	0.21	0.060	0.26	0.075
Agkistrodon piscivorus	0.32	0.090	0.42	0.120	0.53	0.150	1.05	0.300
Crotalus adamanteus	0.84	0.240	1.05	0.300	2.10	0.600	2.65	0.750
Crotalus atrox	0.30	0.090	0.40	0.120	0.80	0.240	2.00	0.600
Crotalus cerastes	0.04	0.012	0.06	0.018				
Crotalus confluentus	0.18	0.050	0.32	0.090				
Crotalus exsul	0.36	0.120	0.72	0.240	1.35	0.450	1.65	0.550
Crotalus horridus	0.21	0.060	0.32	0.090	0.63	0.180		
Crotalus lepidus			0.1	0.03				
Crotalus mitchellii	0.18	0.060	0.30	0.100	0.48	0.160	0.80	0.265
Crotalus molossus			0.60	0.180				
Crotalus oreganus	0.14	0.040	0.23	0.065	0.32	0.090	0.44	0.125
Crotalus tigris			0.18	0.060				
Sistrurus miliarius			0.08	0.02				

De referencia á especie *Crotalus adamanteus* (cascavel da Florida) pode-se dizer que exemplares bem desenvolvidos e conservados em boas condições chegam a secretar maior quantidade de veneno do que a que se acha assignalada no quadro acima, o mesmo acontecendo ás vezes com certos exemplares de *Crotalus atrox* (cascavel do Texas). Na verdade, segundo verificação feita no in-

verno de 1929, pelo Sr. R. E. Stadelman, technico do Antivenin Institute of America (*in* Bull. Antivenin Institute of America III. 1:29.1929), a primeira especie chega a secretar 4 cc. de veneno liquido, correspondentes a 864 millgrs. de veneno secco e a segunda produz ás vezes quasi 2 cc. de veneno liquido, correspondentes a cerca de 600 millgrs. de veneno solido.

d) Estatisticas recentes

E'-me grato assignalar agora que, em resultado da intensiva campanha que o Antivenin Institute of America tem emprehendido com o auxilio de elementos officiaes e de grande numero de associações scientificas e organizações financeiras, no sentido de reduzir o problema ophidico a suas devidas proporções, a mortalidade se está a reduzir rapidamente, conforme eu verifiquei pessoalmente nos Estados Unidos, á luz dos dados que acabam de ser publicados (5) por R. H. Hutchison, Secretario daquelle Instituto.

Essa estatistica veiu mostrar que, durante o anno de 1928, o Antivenin Institute conseguiu communicação de 607 casos de envenenamento ophidico occorridos nos Estados Unidos e trouxe á luz varios factos bastante interessantes, cujo resumo parece ser digno de divulgação. Assim é que, em mais de dois terços, isto é, em 451, dos casos publicados, foi verificada a especie de serpente que determinou o accidente. Nesses, a discriminação das especies foi a seguinte, pela ordem de frequencia relativa:

1.	*A. mokasen*	171 casos
2.	*C. atrox*	100 casos
3.	*A. piscivorus*	43 casos
4.	*C. horridus*	43 casos
5.	*C. confluentus confluentus*	37 casos
6.	*C. confluentus oreganus*	27 casos
7.	*S. miliarius*	18 casos
8.	*C. adamanteus*	12 casos
9.	*C. cerastes*	5 casos
10.	*S. catenatus*	2 casos

O estudo da distribuição desses casos de ophidismo pelos varios Estados da União norte-americana revela que a grande maioria delles provém de centros relativamente populosos, onde naturalmente já se fez sentir mais intensamente a campanha desenvolvida pelos membros do Antivenin Institute e pelas associações que estão com elle philanthropicamente cooperando, o que está a corroborar a affirmação, por mim feita em pagina anterior, de que, com o desenvolvimento do serviço, se virá a ter noticia de um numero pelo menos duplo, sinão triplo, de casos occorridos naquelle país. Elle tambem revela que, na distribuição dos accidentes, o Estado de Texas, onde por signal se encontra a estação ou labora-

torio mais activo do Instituto, occupa o primeiro logar, com 163 casos; o Estado de Alabama, o segundo logar, com 49 casos; o Estado de Pennsylvania, o terceiro logar, com 42 casos; o Estado de Georgia, o quarto logar, com 31 casos; o Estado de California, o quinto logar, com 30 casos; o Estado de Florida, o sexto logar, com 28 casos; o Estado de Virginia, o setimo logar, com 24 casos; o Estado de North Carolina, o oitavo logar, com 23 casos e, assim por diante, em ordem decrescente, os demais Estados, inclusive Vermont, Delaware, Wisconsin, Iowa, North Dakota, Oregon e Washington, de cada um dos quaes o Instituto conseguiu apenas communicação de um caso. Reunidos os Estados por grupos, chega-se á conclusão de que para o total de 607 casos a região do sudeste e do Golfo do Mexico concorreu com 249 accidentes; a do centro-oeste e sudoeste, com 222 accidentes; a do Atlantico norte, com 91 accidentes e a das Montanhas Rochosas e da costa do Pacifico, com 45 casos, o que vem justificar a maior actividade exercida pelo Instituto no sul e no sudoeste da União americana.

A estatistica revela tambem que os accidentes, virtualmente inexistentes no mês de fevereiro, começam progressivamente a augmentar em março, attingindo o apice da curva de incidencia em julho, isto é, em pleno verão, e diminuindo depois gradualmente até os meses do inverno. Alem disso, ella mostra que mais de 50 % dos accidentes foram observados em pessoas de menos de 20 annos de idade; que os individuos de sexo masculino foram victimas em cerca de 69 % de vezes, ao passo que os de sexo feminino o foram em cerca de 31 %; que a picada attingiu os membros inferiores, especialmente os pés, em 57,8 % dos casos, os membros superiores, sobretudo as mãos, em 41 % dos casos, a cabeça e o tronco, apenas em 3 e 2 casos, respectivamente.

Quanto ao tratamento, as communicações recebidas pelo Antivenin Institute no anno de 1928 revelam que entre 433 casos medicados com o antiveneno especifico (sôro polyvalente), só occorreram 13 mortes, o que dá uma mortalidade de 3 %. Esta cifra fala bem claro do rapido successo da campanha anti-ophidica realizada nos Estados Unidos da America do Norte, onde, em apenas 2 annos de trabalho, já se conseguiu um resultado que se pode comparar com vantagem áquelle obtido pelo Instituto Butantan, para a zona centro-meridional do Brasil, em um periodo muito mais longo, segundo se vê no quadro IX acima exarado.

Vem a proposito narrar que, nos Estados Unidos como no Brasil, a campanha anti-ophidica tem seus tropeços, embora muito menos frequentes lá do que cá. A maior difficuldade que ali temos encontrado é oriunda da crença generalizada de que o alcool tem effeito curativo sobre a picada, não sendo, pois, de admirar que, por isto ou sinão pelo desejo de burlar a lei secca, muita gente se embriague em seguida a accidentes ophidicos e, assim, fique em condições de não poder procurar um hospital ou buscar immediatamente uma injecção de antiveneno. Ao demais, existem ali pessoas e algumas de regular cultura que ainda acreditam que o permanganato de potassio possue effeito neutralizante sobre a peçonha. Ha até uma firma que expõe á venda sob a denominação de "Anti-venom" ou

"Snake-bite kit" um remedio cuja base é o permanganato. Ainda recentemente, um ex-conservador ("keeper") - que a nossa imprensa, ao noticiar o facto, em sua costumeira projecção de coisas estrangeiras, transformou logo em "doutor e actual director" do Jardim Zoologico de Nova York - vendo-se picado por uma Cascavel, *C. horridus*, quando caçava em fins da primavera passada, tratou de se injectar com esse tal remedio "Anti-venom" e só procurou o hospital para receber o devido tratamento especifico depois de ter feito uma enorme caminhada e quando já era tarde demais para que o sôro manifestasse seu effeito curativo.

Apezar de alguns obices desta natureza, o emprego do antiveneno vai-se generalizando ali, graças aos meios de propaganda de que o Instituto lança mão, aos recursos materiaes do país e ao manifesto desejo de grande parte da população de experimentar tudo quanto é novo e recommendado pela sciencia.

(Trabalho da Secção de Ophiologia do Instituto Butantan, terminado em setembro de 1930).

BIBLIOGRAPHIA

(1) *Brazil, V.* — Contribuição ao estudo do veneno ophidico, *in* Collectanea Inst. Butantan 1:12.1906.1901-1917; La Défense contre l'Ophidisme :12.1914.

(2) *Willson, P.* — Snake poisoning in the United States, *in* Arch. Int. Med. I:516.1908.

(3) *Amaral, A. do* — The snake-bite problem in the United States and in Central America, *in* Bull. Antiv. Inst. America I(2):31.1927; The anti-snake-bite campaign in Texas and in the sub-tropical United States, *in* loc. cit. I(3):77.1927.

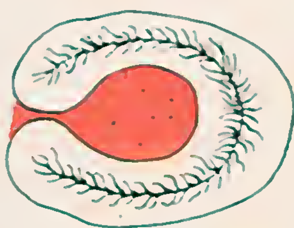
(4) *Amaral, A. do* — Notes on Nearctic poisonous snakes and treatment of their bites. *in* Bull. Antiv. Inst. America I(3):61.1927; Key to the rattlesnakes of the genus *Crotalus* Linné, 1758, *in* loc. cit. III(1):4.1929.

(5) *Hutchison, R. H.* — On the incidence of snake poisoning in the United States and the results of the newer methods of treatment, *in* Bull. Antiv. Inst. America III (2):43.1929.

Serie proteroglypha
Familia Elapidae

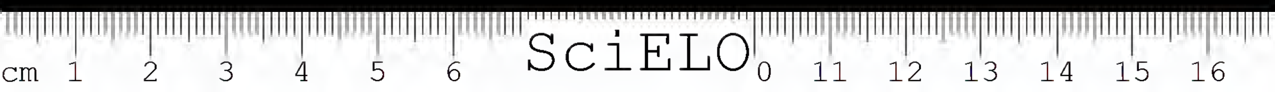


Apparelho de veneno



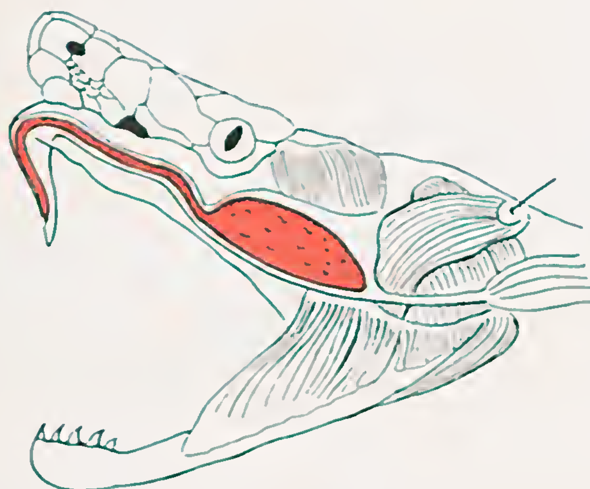
Corte transverso da presa no terço superior

Fig. 1

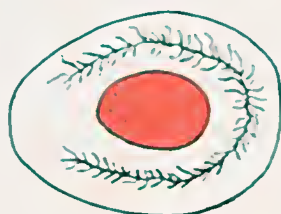

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16

Serie solenoglypha

Familia Crotalidae

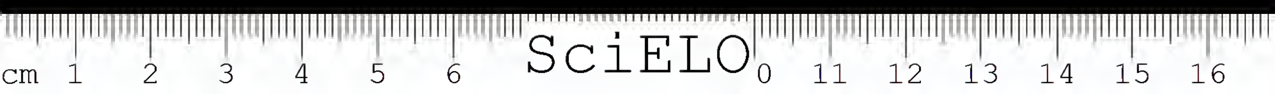


Apparelho de veneno



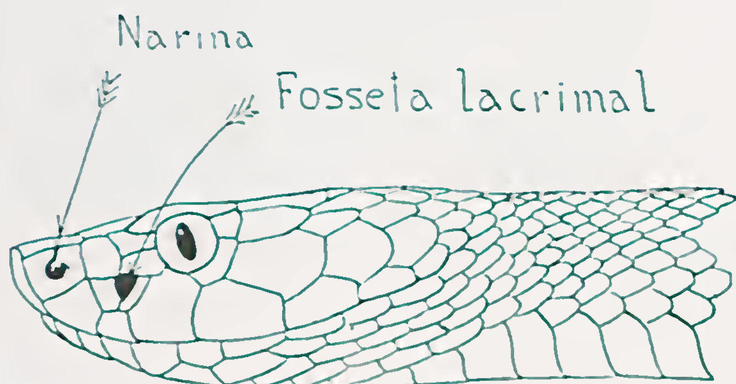
Corte transverso da presa no terço superior

Fig. 2

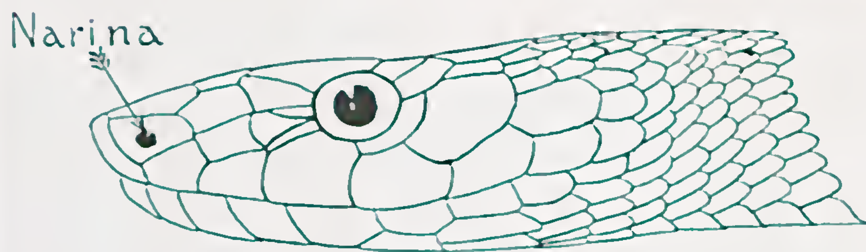

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. V. 1930

Orificios faciaes de serpentes

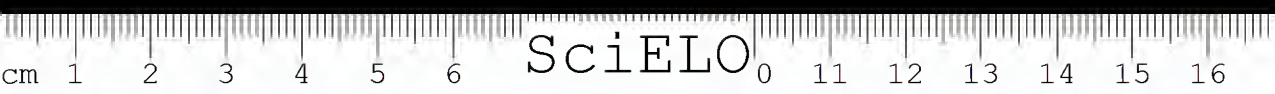


Typo da familia Crotalidae



Typo das demais familias

Fig. 3


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

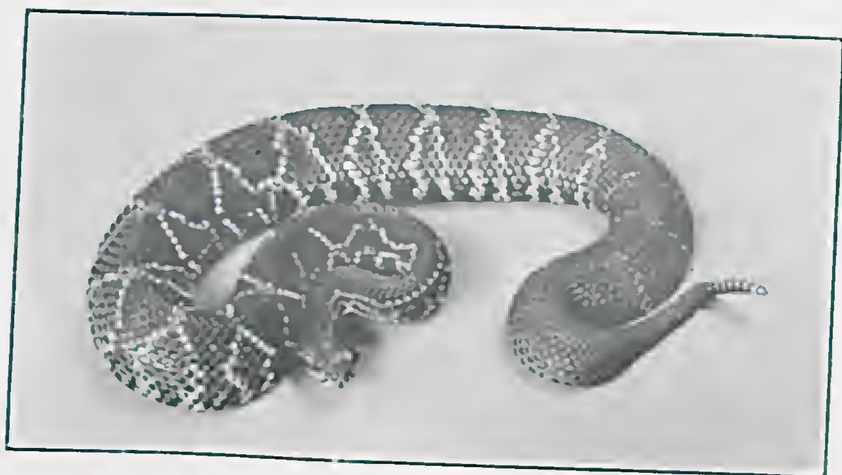


Fig. 4 - Cascavel. *Crotalus terrificus terrificus* (LAURENTIUS).



Fig. 5 - Surucutinga. *Lachesis muta* (LINNEU).

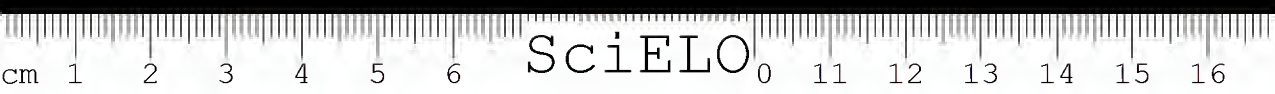

cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
0 11 12 13 14 15 16



Fig. 6 - Jararaca. *Bothrops jararaca* (Wied).

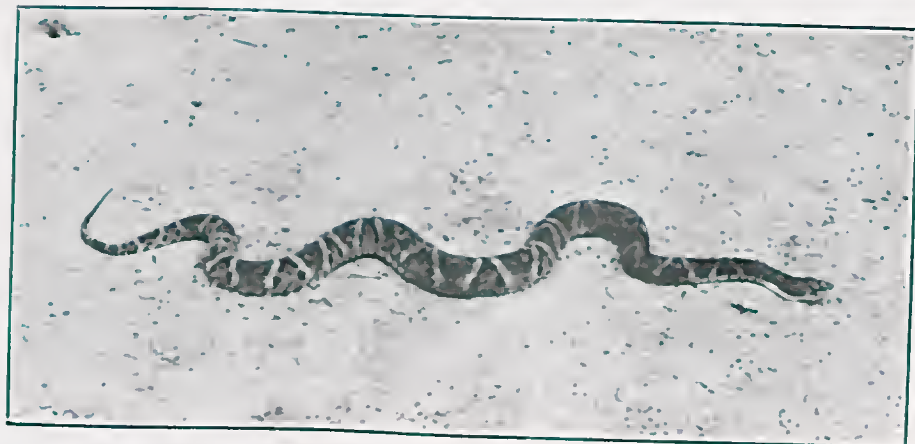
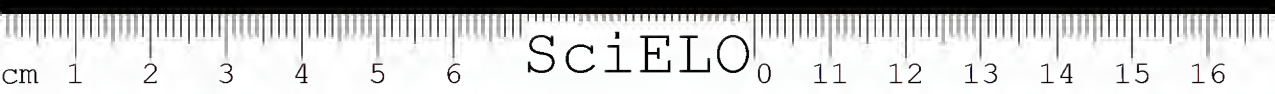


Fig. 7 - Caissaca. *Bothrops atrox* (Linneu).



Fig. 8 - Jararacussú. *Bothrops jararacussu* Lacerda.


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
0 11 12 13 14 15 16

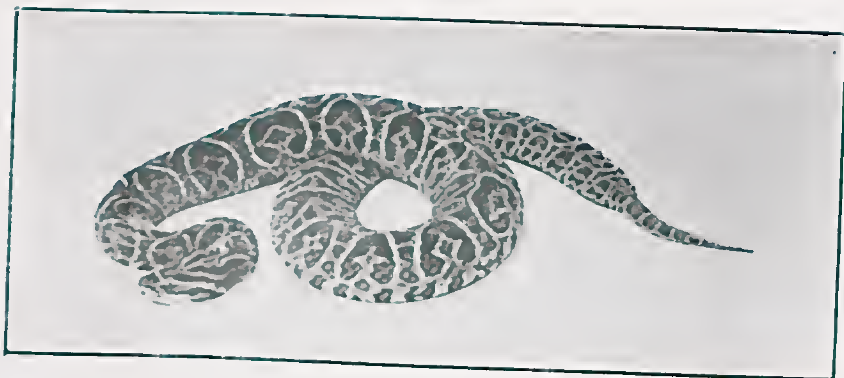


Fig. 9 - Urutú. *Bothrops alternata* D. & B.

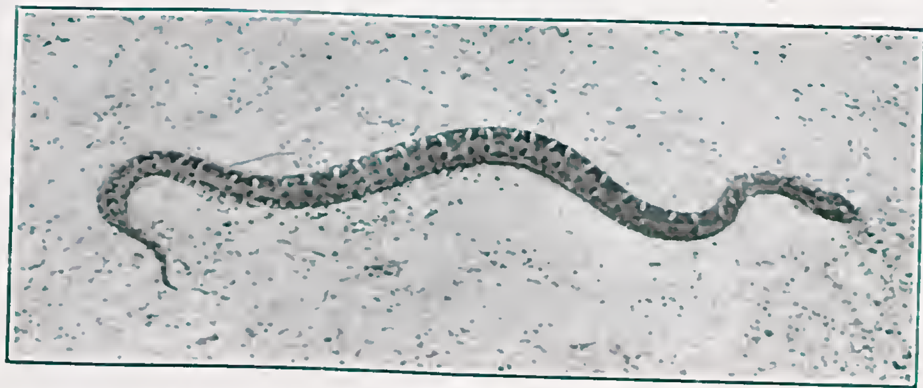


Fig. 10 - Jararaca pintada. *Bothrops neuwiedii* WAGLER.



Fig. 11 - Cotiara. *Bothrops cotiara* (GOMES).

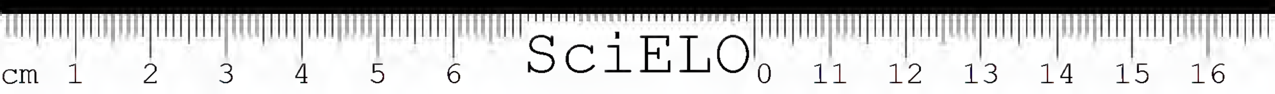

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16



Fig. 12 - Surucucú de patioba. *Bothrops bilineata* (Wied).

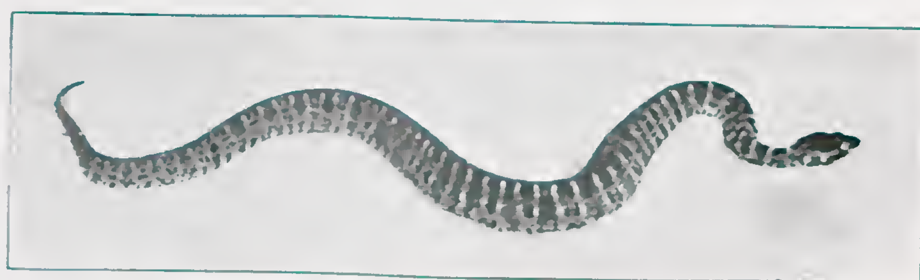
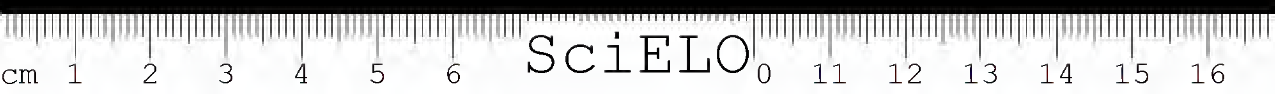


Fig. 13 - Cotiarinha. *Bothrops itapetiningae* (Boulenger).


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. V. 1930

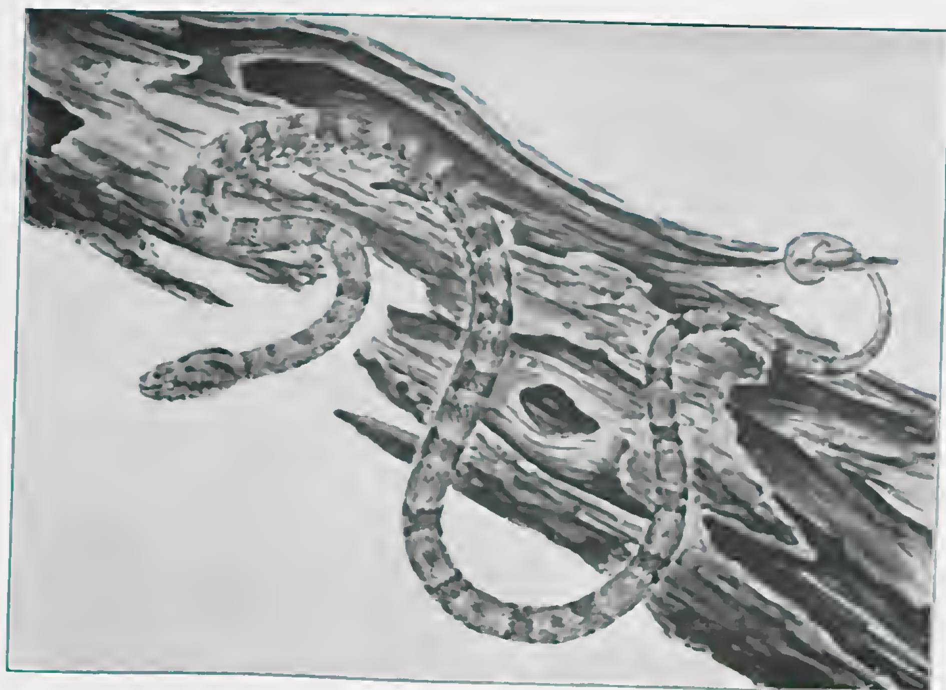
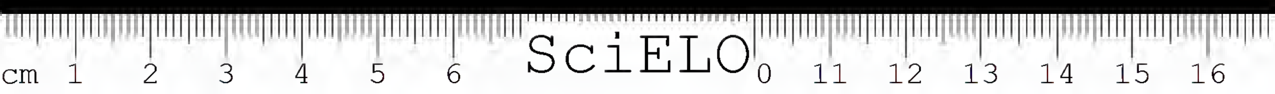


Fig. 14 - Jararaca cinzenta. *Bothrops castelnaudi* D. & B.



Fig. 15 - Jararaca ilhoa. *Bothrops insularis* (AMARAL).


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

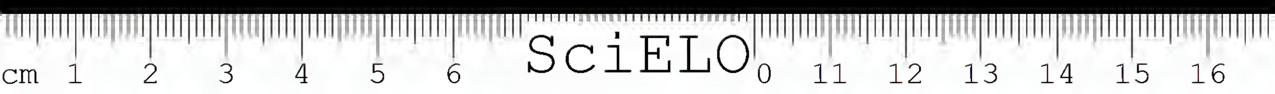
Mem. Inst. Butantan
Vol. V. 1930



Fig. 16 - Jararaca do sertão. *Bothrops erythromelas* AMARAL.



Fig. 17 - *Bothrops iglesiasi* AMARAL


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
0 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. V. 1930

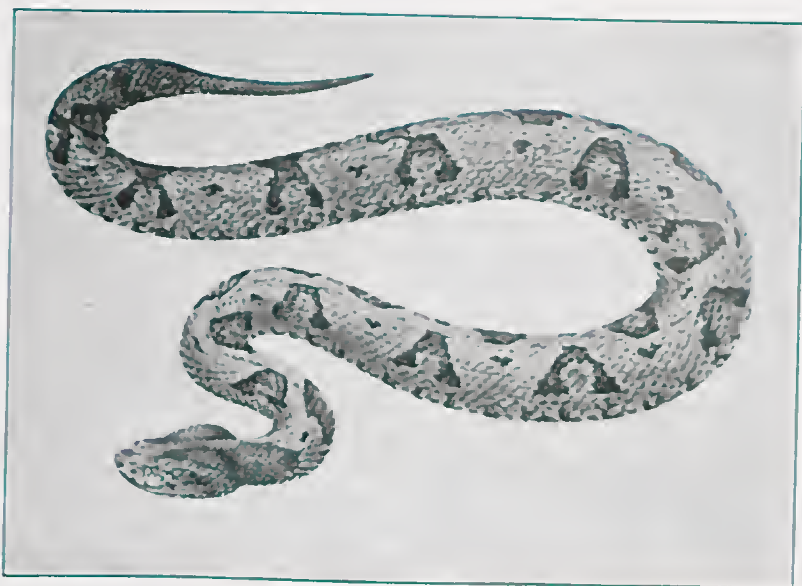


Fig. 18 - *Bothrops pirajai* AMARAL

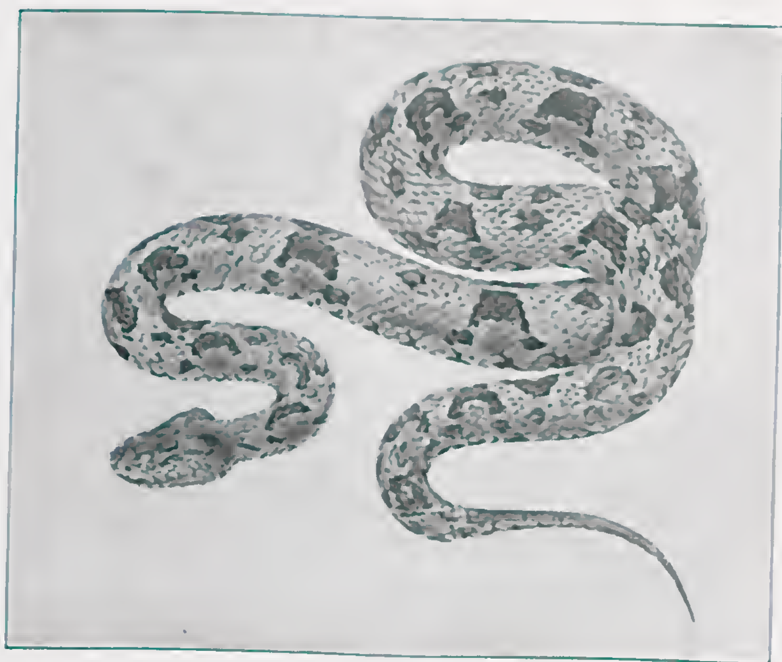
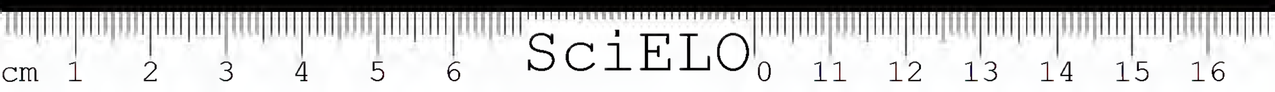


Fig. 19 - *Bothrops neglecta* AMARAL


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16


FREQUENCIA DOS ACCIDENTES OPHIDICOS
SEGUNDO O SEXO E A IDADE DAS VICTIMAS
HOMENS
63%
MULHERES
13%
CRIANÇAS
24%

Fig. 21

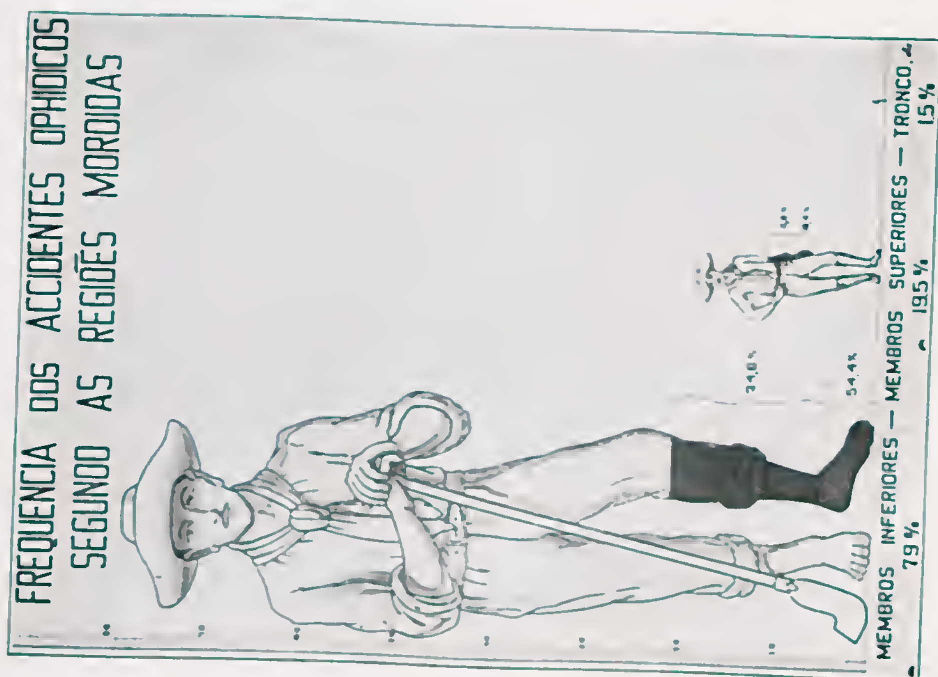
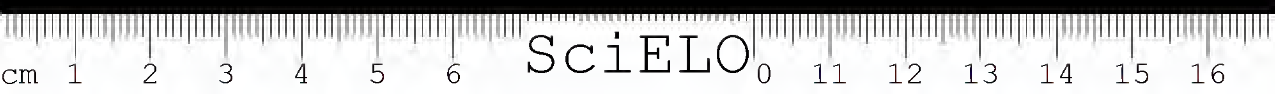

FREQUENCIA DOS ACCIDENTES OPHIDICOS
SEGUNDO AS REGIÕES MORDIDAS
MEMBROS INFERIORES — MEMBROS SUPERIORES — TRONCO
79%
19.5%
1.5%

Fig. 20


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16

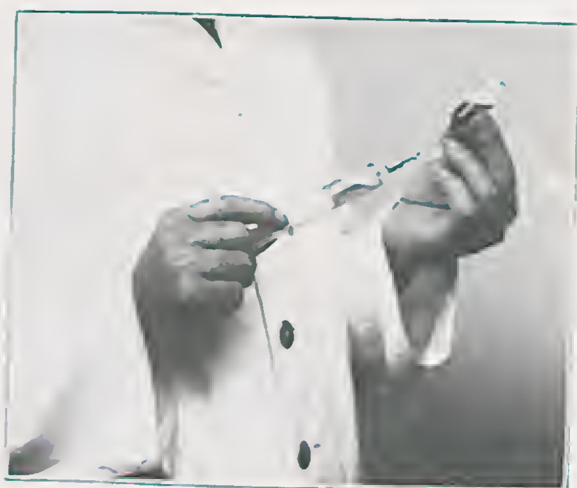
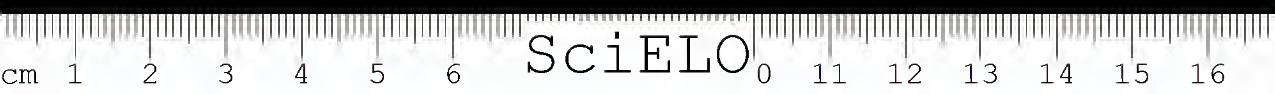


Fig. 22 - Enchendo a seringa



Fig. 23 - Injectando o sôro


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16

REGRAS INTERNACIONAES DE NOMENCLATURA ZOOLOGICA

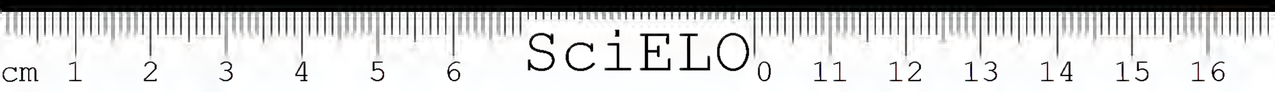
TRADUCÇÃO PARA O PORTUGUÊS

POR

AFRANIO DO AMARAL

1ª EDIÇÃO




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

REGRAS INTERNACIONAES DE NOMENCLATURA ZOOLOGICA

TRADUCÇÃO PARA O PORTUGUÊS

POR

AFRANIO DO AMARAL

Director do Instituto Butantan e do
Antivenin Institute of America

JUSTIFICAÇÃO

Ha muitos annos se vem fazendo sentir nos meios scientificos do Brasil e de Portugal a necessidade duma edição portuguesa das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica, obrigados como se vêem os technicos dos dois países ao manuseio constante de edições em linguas estrangeiras, com cujas particularidades nem sempre têm elles a ventura de estar familiarizados. A crescente contribuição, oriunda de Portugal e especialmente do Brasil, ao progresso da zoologia em geral e da zoologia medica em particular, justifica por sem duvida o esforço que resolvi fazer ao traduzir aquellas Regras para nossa lingua.

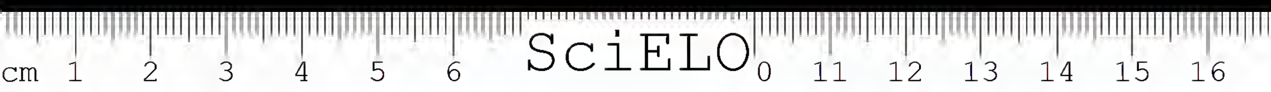
Na verdade, deste assumpto já me venho occupando ha alguns annos. Assim é que, em 1925 e 1926, publiquei, na Revista do Museu Paulista, varias notas sobre Questões de Nomenclatura Ophiologica, para justificar a passagem, para a synonymia, de algumas especies de ophidios consideradas até então como validas. Tambem em 1925 o Harvard Institute for Tropical Biology and Medicine reuniu no volume II de suas "Contributions" uma serie de artigos meus, em alguns dos quaes tratava eu de repôr em seus devidos termos outras questões attinentes á nomenclatura de ophidios neotropicos.

Ao ter conhecimento desses trabalhos que estavam a revelar um provavel interesse por este assumpto em nosso meio, o secretario da Commissão Internacional de Nomenclatura Zoologica e membro do Instituto Nacional de Saúde de Washington, Prof. Charles W. Stiles, me convidou, em fins de 1927, a traduzir para o português o importante Codigo, que tão precioso auxilio tem prestado a quantos trabalham em systematica zoologica.

Parece-me desnecessario encarecer a necessidade da introducção de um Codigo dessa natureza em nossa lingua, porquanto ao nosso meio é perfeitamente applicavel a opinião, expressa por aquella Commissão, de que se pode com segu-

rança asseverar que relativamente poucos zoologos, ao começarem a sua carreira profissional, fazem uma idéa, perfunctoria que seja, das questões de nomenclatura, devido especialmente a que não se exige ainda, em nossos Collegios ou Faculdades, qualquer conhecimento de grammatica zoologica por parte daquelles que se candidatam a um diploma scientifico. Por isso mesmo, é de esperar que a presente edição receba benevolo acolhimento da parte dos zoologos brasileiros e portugueses, cujas suggestões serão tomadas no devido apreço para a progressiva melhora do trabalho em futuras tiragens.

São Paulo, setembro de 1930



REGRAS INTERNACIONAES DE NOMENCLATURA ZOOLOGICA

REGRAS E RECOMMENDAÇÕES

CONSIDERAÇÕES GERAES

ARTIGO 1 - A nomenclatura zoologica é independente da nomenclatura botanica no sentido de que o nome de um animal não se rejeita simplesmente por ser identico ao nome de uma planta. Si, todavia, um organismo é transferido do reino vegetal para o animal, seus nomes botanicos devem ser acceitos em nomenclatura zoologica com seu valor botanico original; e si um organismo é transferido do reino animal para o vegetal, seus nomes retêm o valor zoologico.

Recommendação - Faz-se bem em evitar a introducção em zoologia de nomes genericos já em uso em botanica.

ARTIGO 2 - A designação scientifica de animaes é uninominal para subgeneros e todos os grupos mais altos, binominal para especies e trinominal para subespecies.

Vide Opiniões Nos. 19, 20, 24, 35, 43, 46, 50, 54.

ARTIGO 3 - Como nomes scientificos de animaes se devem usar palavras que sejam latinas ou latinizadas, ou então consideradas e tratadas como taes, no caso de não serem de origem classica.

NOMES DE FAMILIAS E SUBFAMILIAS

ARTIGO 4 - O nome de uma familia se forma pela addição da terminação *idae* e o de uma subfamilia pela addição de *inae*, á raiz do nome de seu genero typo.

ARTIGO 5 - O nome de uma familia ou subfamilia deve ser mudado quando se troca o nome de seu genero typo.

NOMES GENERICOS E SUBGENERICOS

ARTIGO 6 - Os nomes genericos e subgenericos estão sujeitos ás mesmas regras e recommendações e, do ponto de vista da nomenclatura, são coordenados, isto é, possuem o mesmo valor.

Vide Opinião No. 72.

ARTIGO 7 - Um nome generico torna-se subgenerico, quando o genero correspondente passa a subgenero, e *vice-versa.*

ARTIGO 8 - Um nome generico deve consistir de uma só palavra, simples ou composta, escripta com letra maiuscula inicial e empregada como substantivo no nominativo singular. Exemplos: *Canis, Perca, Ceratodus, Hymenolepis.*

Recommendação - Certos grupos biologicos, propostos distinctamente como grupos collectivos e não como unidades systematicas, podem ser tratados por conveniencia como si fossem generos, mas sem requererem especie typo. Exemplos: *Agamodistomum, Amphistomulum, Agamofilaria, Agamomermis, Sparganum.*

Vide Opinião No. 44.

Recommendações - As seguintes palavras podem ser usadas como nomes genericos:

a) Substantivos gregos, com os quaes se devem seguir as regras de transcripção latina [transliteração (vide Appendice F)]. Exemplos: *Ancylus, Amphibola, Aplysia, Pompholyx, Physa, Cyliehna.*

b) Vocabulos gregos compostos, nos quaes o attributivo deve preceder a palavra principal. Exemplos: *Stenogyra, Pleurobranchus, Tylodina, Cyclostomum, Sarcocystis, Pelodytes, Hydrophilus, Rhizobius.*

Isto, todavia, não exclue vocabulos formados á maneira de *Hippopotamus*, isto é, vocabulos em que o attributivo segue a palavra principal. Exemplos: *Philydrus, Biorhiza.*

c) Substantivos latinos. Exemplos: *Ancilla, Auricula, Dolium, Harpa, Oliva.* Adjectivos (*Prasina*) e participios passados (*Productus*) não são recommendados.

d) Vocabulos latinos compostos. Exemplos: *Stiliger, Dolabrifer, Semifusus.*

e) Derivados gregos ou latinos que exprimam diminuição, comparação, semelhança, ou posse. Exemplos: *Dolium, Doliolum; Strongylus, Eustrongylus; Limax, Limacella, Limacia, Limacina, Limacites, Limacula; Lingula, Lingulella, Lingulepis, Lingulina, Lingulops, Lingulopsis; Neomenia, Proneomenia; Buteo, Archibuteo; Gordius, Paragordius, Polygordius.*

f - Nomes mythologicos ou heroicos. Exemplos: *Osiris, Venus, Brisinga, Velleda, Crimora.* Si não forem latinos, taes nomes devem receber uma terminação latina (*Aegirus, Göndulia*).

g) Nomes proprios usados pelos antigos. Exemplos: *Cleopatra, Belisarius, Melania.*

h) Patronymicos modernos, aos quaes se junta uma terminação que denote dedicatoria:

α. Nomes que acabam por uma consoante, recebem a terminação *ius, ia,* ou *ium.* Exemplos: *Selysius, Lamarckia, Köllikeria, Mülleria, Stålia, Krøyeria, Ibañezia.*

β. Nomes que acabam pelas vogaes *e, i, o, u,* ou *y*, recebem a terminação *us, a* ou *um.* Exemplos: *Blainvillea, Wyvillea, Carolinia, Fatioa, Bernaya, Quoya, Schulzea.*

γ. Nomes que acabam por *a*, recebem a terminação *ia.* Exemplo: *Danaia.*

δ. Em nomes genericos formados de patronymicos, omittem-se as particulas que não estejam ligadas com o nome, mas retêm-se os artigos. Exemplos: *Blainvillea, Benedenia, Chiajea, Lacepedea, Dumerilia.*

ε. Com patronymicos que consistam de dois vocabulos, apenas um destes se usa na formação de um nome generico. Exemplos: *Selysius, Targionia, Edwardsia, Duthiersia.*

ζ. O uso de substantivos proprios na formação de nomes genericos compostos é objectavel. Exemplos: *Eugrimmia, Buchiceras, Heromorpha, Möbiusispongia.*

i) Nomes de navios que se devem considerar como mythologicos (*Vega*) ou como patronymicos modernos. Exemplos: *Blakea, Hirondellea, Challengeria.*

j) Nomes barbaros, isto é, de origem não classica. Exemplos: *Vanikoro, Chilosa.* Taes palavras podem receber uma terminação latina. Exemplos: *Yetus, Fossarus.*

k) Palavras formadas por combinação arbitraria de letras. Exemplos: *Neda, Clanculus, Salifa, Torix.*

l) Nomes formados por anagramma. Exemplos: *Dacelo, Verlusia, Linospa.*

ARTIGO 9 - Si um genero é dividido em subgeneros, o nome do subgenero typico deve ser o mesmo que o do genero (vide Art. 25).

ARTIGO 10 - Quando se deseja citar o nome de um subgenero, colloca-se esse nome entre parentheses depois do generico e antes do especifico. Exemplos: *Venessa (Pyrameis) cardui.*

NOMES ESPECIFICOS E SUBESPECIFICOS

ARTIGO 11 - Os nomes especificos e subespecificos estão sujeitos ás mesmas regras e recommendações e, do ponto de vista da nomenclatura, são coordenados, isto é, possuem o mesmo valor.

ARTIGO 12 - Um nome especifico torna-se subespecifico, quando a especie correspondente passa a subespecie, e *vice versa.*

ARTIGO 13 - Embora substantivos especificos derivados de nomes de pessoas se possam escrever com letra maiuscula inicial, todos os demais nomes especificos devem ser escriptos com minuscula inicial. Exemplos: *Rhizostoma Cuvieri* ou *Rh. cuvieri, Francolinus Lucani* ou *F. lucani, Hypoderma Diana* ou *H. diana, Laophonte Mohammed* ou *L. mohammed, Œstrus ovis, Corvus corax.*

ARTIGO 14 - São nomes especificos:

a) Adjectivos que grammaticalmente devem concordar com o nome generico. Exemplo: *Felis marmorata.*

b) Substantivos no nominativo em apposição ao nome generico. Exemplo *Felis leo.*

c) Substantivos no genitivo. Exemplos: *rosae, sturionis, antillarum, galliae, sancti-pauli, sanctae-helenae.*

Si o nome é escolhido como dedicatoria a uma ou mais pessoas, forma-se o genitivo de accordo com as regras de declinação latina desde que o nome tenha sido empregado e declinado em latim. Exemplos: *plinii, aristotelis, victoris, antonii, elisabethae, petri* (nome dado).

Si o nome é um patronymico moderno, forma-se sempre o genitivo pela addição, ao nome exacto e completo, de *i* si a pessoa for homem ou de *ae* si a pessoa for mulher, mesmo que o nome tenha uma forma latina; colloca-se no plural si a dedicatoria comprehende varias pessoas do mesmo nome. Exemplos: *cuvieri, möbiusi, nuñezi, merianae, sarasinorum, bosi* (não *bovis*), *salmoni* (não *salmonis*).

Recommendação - O melhor nome especifico é um adjectivo latino, curto, euphonico e de facil pronuncia. Vocabulos gregos latinizados ou barbaros podem, todavia, ser usados. Exemplos: *gymnocephalus, echinococcus, ziczac, aguti, hoactli, urubitinga.*

E' bom evitar-se a introducção dos nomes *typicus* e *typus* para designar especies ou subespecies novas, porquanto taes nomes são sempre capazes de produzir confusão futura.

Vide Opiniões Nos. 8, 50, 64.

Artigo 15 - O emprego de nomes proprios compostos que indiquem dedicatoria, ou de vocabulos compostos que indiquem comparação com um objecto simples não representa excepção ao Art. 2. Nestes casos, os dois vocabulos que compõem o nome especifico são escriptos como uma só palavra com ou sem hyphen. Exemplos: *Sanctae-Catharinae* ou *sanctaecatharinae, jan-mayeni* ou *janmayeni, cornu-pastoris* ou *cornupastoris, cor-anguinum* ou *coranguinum, cedo-nulli* ou *cedonulli.*

Expressões como *rudis planusque* não são admissiveis como nomes especificos.

Vide Opinião No. 50.

Artigo 16 - Nomes geographicos devem ser empregados como substantivos no genitivo, ou collocados em forma adjectiva. Exemplos: *sancti-pauli, sanctae-helenae, edwardiensis, diemenensis, magellanicus, burdigalensis, vindobonensis.*

Recommendação - Nomes geographicos usados pelos romanos ou escriptores latinos da edade media devem ser adoptados de preferencia a formas mais recentes. Palavras como *bordeausiacus* e *viennensis* são más, todavia não devem ser rejeitadas por isso.

Artigo 17 - Si se deseja citar o nome subespecifico, deve-se escrever tal nome immediatamente após o especifico, sem a interposição de qualquer signal de pontuação. Exemplo: *Rana esculenta marmorata* Hallowell, mas não *Rana esculenta* (*marmorata*) ou *Rana marmorata* Hallowell.

Artigo 18 - A notação de hybridos pode-se fazer de varias maneiras; em todos os casos o nome do pai precede o da mãi, com ou sem os symbolos do sexo:

a) Os nomes dos dois pais são unidos pelo signal de multiplicação (×). Exemplo: *Capra hircus* ♂ × *Ovis aries* ♀ e *Capra hircus* × *Ovis aries* são formas igualmente boas.

b) Podem-se tambem citar hybridos sob forma de fracção, ficando o pai como numerador e a mãi como denominador. Exemplo: $\frac{\textit{Capra hircus}}{\textit{Ovis aries}}$. Este segundo methodo é preferivel, tanto mais quanto permitte a citação da pessoa que primeiro publicou a forma hybrida como tal. Exemplo: $\frac{\textit{Bernicla canadensis}}{\textit{Anser cygnoides}}$ Rabé.

c) A forma de fracção tambem é preferivel quando um dos pais é hybrido. Exemplo: $\frac{\textit{Tetrao} \times \textit{Tetrao urogallus}}{\textit{Gallus gallus}}$. Todavia, para o ultimo caso se podem usar parentheses. Exemplo: (*Tetrao tetrix* × *Tetrao urogallus*) × *Gallus gallus*.

d) Quando os pais do hybrido não são conhecidos como taes [pais], o hybrido recebe provisoriamente o nome especifico como si fosse uma verdadeira especie e não um hybrido; todavia, o nome generico é precedido pelo signal de multiplicação. Exemplo: × *Coregonus dolosus* Fatio.

FORMAÇÃO, DERIVAÇÃO E ORTHOGRAPHIA DE NOMES ZOOLOGICOS

Artigo 19 - A orthographia original de um nome deve ser conservada a menos que deixe transparecer um erro de transcripção, um *lapsus calami* ou um erro typographico.

Vide Opiniões Nos. 8, 26, 27, 29, 34, 36, 41, 60, 61, 63, 70.

Recommendação - Na graphia de nomes scientificos é aconselhavel o uso de caracteres differentes dos empregados no texto. Exemplo: *Rana esculenta* [italicos] Linneu, 1758, vive na Europa.

Artigo 20 - Na formação de nomes derivados de linguas em que se usa o alphabeto latino, deve-se conservar exactamente a graphia original, inclusive signaes diacriticos. Exemplos: *Selysius, Lamarckia, Köllikeria, Mülleria, Stålia, Krøyeria, Ibañezia, möbiusi, medići, cžjžeki, spitzbergensis, islandicus, paraguayensis, patagonicus, barbadensis, färöensis*.

Recommendações - Os prefixos *sub* e *pseudo* devem ser usados somente com adjectivos e substantivos, *sub* com vocabulos latinos, *pseudo* com vocabulos gregos e não devem apparecer ligados a nomes proprios. Exemplos: *subviridis, subchelatus, Pseudacanthus, Pseudophis, Pseudomys*. Palavras como *sub-wilsoni* e *pseudo-grateloupana* não são recommendadas.

As terminações *oides* e *ides* só devem ser empregadas em combinação com substantivos gregos ou latinos; não o devem em combinação com nomes proprios.

Nomes geographicos e patronymicos de paises que não têm orthographia reconhecida ou que não usam o alphabeto latino, devem ser transcriptos para o latim de accordo com as regras adoptadas pela Sociedade Geographica de Paris. (Vide Appendice G).

Na creação de novas designações baseadas em nomes proprios de pessoas, escriptos algumas vezes com ä, ö ou ü, outras vezes com ae, oe e ue, recommenda-se que os auctores adoptem ae, oe e ue. Exemplo *muelleri* de preferencia a *mülleri*.

NOME DE AUCTOR

ARTIGO 21 - O auctor de um nome scientifico é aquella pessoa que primeiro publica o nome ligado a uma indicação, definição, ou descripção, a menos que esteja claro no texto da publicação que alguma outra pessoa é responsavel por tal nome e sua indicação, definição, ou descripção.

ARTIGO 22 - Desejando-se citar, o nome do auctor deve seguir o nome scientifico sem interposição de qualquer signal de pontuação; outras citações que se desejem (data, *sp. n.*, *emend.*, *sensu stricto*, etc.) devem seguir o nome do auctor, ficando delle separadas por virgula ou parentheses. Exemplos: *Primates* Linneu, 1758, ou *Primates* Linneu (1758).

Recommendação - Na abreviação do nome do auctor de uma designação scientifica, o escriptor andará bem si seguir a lista de abreviaturas publicada pelo Museu Zoologico de Berlim (1).

ARTIGO 23 - Quando se transfere uma especie para um genero differente do original ou se combina o nome especifico com qualquer nome generico differente daquelle com que o primeiro foi publicado originalmente, deve-se reter na notação, mas collocar entre parentheses, o nome do auctor de tal designação especifica. Exemplos: *Taenia lata* Linneu, 1758, e *Dibothriocephalus latus* (Linneu, 1758); *Fasciola hepatica* Linneu, 1758, e *Distoma hepaticum* (Linneu, 1758).

Desejando-se citar o auctor da nova combinação, escreve-se-lhe o nome depois dos parentheses. Exemplo: *Limnatis nilotica* (Savigny, 1820) Moquin-Tandon, 1826.

ARTIGO 24 - Quando se divide uma especie, as especies restrictas a que estava ligado o nome especifico original da especie primitiva, podem receber uma notação que indique, tanto o nome do auctor original, quanto o do revisor. Exemplo: *Taenia solium* Linneu, partim, Goeze.

LEI DE PRIORIDADE

ARTIGO 25 - O nome valido de um genero ou especie só pode ser aquelle sob que um genero ou especie foi primeiro designado, contanto que:

a) Tal nome tenha sido publicado e acompanhado de uma indicação, ou definição, ou descripção; e

b) O auctor tenha applicado os principios de nomenclatura binaria.

Vide Opiniões Nos. 1, 2, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24, 28, 37-40, 46, 49-54, 56-59, 65-67, 73-78, 84, 85, 87, 88, 90.

---

(1) Liste der Autoren zoologischer Art-und Gattungsnamen zusammengestellt von den Zoologen des Museum für Naturkunde in Berlin. Berlin, 2. vermehrte Auflage, 8°, 1896.

NOTA DO TRADUCTOR: Devo frisar aqui que a redacção deste artigo 25, sobre a lei de prioridade, foi modificada e ampliada pelo Congresso Internacional de Zoologia reunido em Budapest, Hungria, de 4 a 9 de setembro de 1927. Com as modificações introduzidas, conforme recommendação unanime da Commissão Internacional de Nomenclatura Zoologica, este artigo 25 ficou assim redigido:

Artigo 25 - O nome valido de um genero ou especie só pode ser aquelle sob que um genero ou especie foi primeiro designado, contanto que:

a) tal nome (antes de 1.º de janeiro de 1931) tenha sido publicado e acompanhado de uma indicação, ou definição, ou descripção; e

b) o auctor tenha applicado os principios de nomenclatura binaria.

c) Todavia, qualquer nome generico ou especifico publicado após 31 de dezembro de 1930 só terá caracter de aproveitabilidade (e, portanto, tambem de validez) á luz das Regras, si for, e somente depois que for, publicado,

(1) com um resumo de caracteres (ou diagnose; ou definição; ou descripção condensada) que differencie ou distinga o genero ou a especie, de outro genero ou especie;

(2) ou com uma clara citação bibliographica de tal resumo de caracteres (ou diagnose; ou definição; ou descripção condensada). Ainda mais,

(3) tratando-se de um nome generico, com a designação definida e clara da especie typo (ou genotypo; ou autogenotypo; ou orthotypo).

Outrosim, a alludida Commissão adoptou ainda a seguinte resolução:

a) pede-se a qualquer auctor que, ao publicar um nome como novo, declare positivamente que elle é novo, que faça esta declaração apenas em uma publicação (isto é, na primeira), e que não junte a data ao nome no momento de sua primeira publicação.

b) pede-se a qualquer auctor que, ao citar um nome generico, especifico, ou subespecifico, indique pelo menos uma vez o do auctor e o anno da publicação do nome citado, ou uma indicação bibliographica completa.

APPLICAÇÃO DA LEI DE PRIORIDADE

Artigo 26 - A decima edição do *Systema Naturae* de Linneu (1758) é o trabalho que iniciou a applicação geral consistente da nomenclatura binaria em zoologia. Portanto, a data 1758 é acceita como ponto de partida da nomenclatura zoologica e da Lei de Prioridade.

Vide Opiniões Nos. 3, 12, 13, 15, 16, 51, 52.

Artigo 27 - A Lei de Prioridade prevalece e por consequencia o mais antigo nome aproveitavel se retém:

a) Quando se designa qualquer parte de um animal antes do proprio animal;

b) Quando se designa qualquer phase evolutiva antes do adulto;

c) Quando os dois sexos de um animal se têm considerado como especies distinctas ou mesmo como pertencentes a generos differentes;

d) Quando um animal representa uma successão regular de gerações dissemelhantes que se têm considerado como pertencentes a especies distinctas ou mesmo a generos differentes.

Vide Opiniões Nos. 44, 48.

ARTIGO 28 - Um genero formado pela fusão de dois ou mais generos ou subgeneros recebe o nome valido mais velho, generico ou subgenerico, de seus componentes. Si os nomes tiverem a mesma data, prevalecerá o escolhido pelo primeiro revisor.

A mesma regra é applicavel quando se unem duas ou mais especies ou subespecies para formar uma só especie ou subespecie.

Recommendação - Na ausencia de qualquer revisão previa, recommenda-se o estabelecimento da precedencia pelo seguinte processo:

a) Um nome generico acompanhado de especificação de um typo tem precedencia a um nome sem tal especificação. Si todos os generos tiverem, ou nenhum tiver, typos especificados, dá-se preferencia àquelle nome generico cuja diagnose for a mais apropriada.

b) Um nome especifico acompanhado de descripção e gravura tem preferencia a outro acompanhado só de diagnose, ou só de gravura.

c) Em igualdade de condições, deve-se preferir aquelle nome que apparece primeiro na publicação (precedencia de pagina).

Vide Opinião No. 40.

ARTIGO 29 - Si se divide um genero em dois ou mais generos restrictos, o nome valido deve ser retido para um dos generos restrictos. Si um typo tiver sido estabelecido originalmente para tal genero, retém-se o nome generico para o genero restricto que contenha esse typo.

Recommendação - Para facilitar a citação, recommenda-se que, quando se tomar uma especie mais antiga como typo de um genero novo, se combine realmente o nome della com o novo nome generico que se citará tambem com o nome antigo do genero. Exemplo: *Gilbertella* Eigenmann, 1903, Smithsonian Misc. Coll., v.45, p.147, typos *Gilbertella alata* (Steindachner) = *Anacyrtus alatus* Steindachner.

Vide Opinião No. 10.

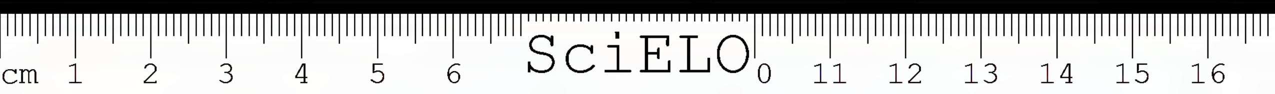
ARTIGO 30 - A designação da especie typo de generos deve obedecer ás seguintes regras (a-g), applicaveis na seguinte ordem de precedencia:

Vide Opiniões Nos. 11, 14, 18, 23, 31-33, 42, 43, 45, 62, 68, 69, 71, 79, 81, 86.

I. Casos em que o typo generico é acceito *apenas* por motivo da publicação original:

a) Quando, na publicação original de um genero, uma das especies é positivamente designada como typo, essa especie será acceita como typo, a despeito de quaesquer outras considerações (Typo por designação original). (Vide Opinião No. 7).

b) Si, na publicação original de um genero, o termo *typicus* ou *typus* for usado como um *novo* nome especifico para uma das especies, este será tomado como "typo por designação original".



c) Um genero proposto com uma só especie original toma essa especie como typo (Generos monotypicos). (Vide Opiniões 6, 9, 22, 30, 42, 47).

d) Si um genero, sem typo originalmente designado (como em *a*) ou indicado (como em *b*), contém entre suas especies originaes uma que possua com o caracter especifico ou subespecifico o nome generico, seja elle valido ou synonymo, tal especie ou subespecie se torna *ipso facto* typo do genero (Typo por tautonymia absoluta). (Vide Opiniões Nos. 16, 33, 35).

II. Casos em que o typo generico não é acceito apenas por motivo da publicação original:

e) Excluem-se de consideração as seguintes especies na determinação de typos de generos (Vide Opiniões Nos. 14, 32, 35, 56):

α. Especies que não estavam incluidas sob o nome generico por occasião da publicação original.

β. Especies que eram *species inquirendae* no ponto de vista do auctor do nome generico, por occasião da publicação.

γ. Especies que o auctor ligou em duvida ao proprio genero por elle creado.

f) Caso um nome generico sem typo originalmente designado seja proposto como substituto para outro nome generico, com ou sem typo, o typo de qualquer dos dois, uma vez estabelecido, torna-se *ipso facto* typo do outro. (Vide Opiniões Nos. 9, 46).

g) Si um auctor, ao publicar um genero com mais de uma especie valida, deixa de designar (como em *a*), ou de indicar (como em *b* e *d*) o typo, este pode ser escolhido por qualquer auctor subsequente e tal designação não está sujeita a mudança (Typo por designação subsequente). (Vide Opiniões Nos. 6, 9, 10, 32, 56).

O sentido da expressão "escolher o typo" deve ser tomado ao pé da letra. Menção de uma especie como illustração ou exemplo de um genero, não constitue selecção de um typo.

III. *Recommendações* - Na escolha de typos por designação subsequente, os auctores farão bem em seguir as seguintes recommendações:

h) Em caso de generos linneanos, escolher como typo a especie mais commum ou a medicinal (Regra linneana, 1751).

i) Si um genero sem typo designado contém entre as suas especies originaes uma que possua como designação especifica ou subespecifica, quer valida, quer synonyma, um nome que seja virtualmente o mesmo que o generico, ou da mesma origem ou da mesma significação que elle, a escolha deve recahir em tal especie no acto da designação do typo, a menos que tal escolha seja fortemente contraindicada por outros factores (Typo por tautonymia virtual). Exemplos: *Bos taurus, Equus caballus, Ovis aries, Scomber scombrus, Sphaerostoma globiporum;* contraindicada em *Dipetalonema* (comparar com a especie *Filaria dipetala*, de que apenas foi descripto um sexo, baseado em um exemplar e não estudado minuciosamente).

j) Si o genero contém especies exoticas e não exoticas no ponto de vista do auctor original, a escolha do typo deve recahir em especie não exotica.

k) Si algumas das especies originaes tiverem sido depois classificadas em outros generos, deve-se dar preferencia ás especies que houverem permanecido no genero original (Typo por eliminação).

l) Especies baseadas em exemplares sexualmente maduros devem ter precedencia a especies baseadas em formas larvarias ou immaturas.

m) Dar preferencia a especies designadas pelos nomes *communis, vulgaris, medicinalis* ou *officinalis*.

n) Dar preferencia á especie mais bem descripta, figurada, ou conhecida, ou mais facilmente obtenivel ou áquella de que se pode obter um exemplar typo.

o) Dar preferencia a uma especie pertencente a um grupo que contenha um numero tão grande quanto possivel de especies (Regra de De Candolle).

p) Em generos parasitarios escolher, si possivel, uma especie que occorra no homem ou algum animal usado como alimento, ou em alguma especie hospedeira muito commum e espalhada.

q) Em igualdade de condições, preferir uma especie que o auctor do genero tenha realmente estudado quando, ou antes que, propôs o genero.

r) Tratando-se de escriptores que costumavam collocar como cabeça ("chef de file") uma certa especie principal ou typica e descrever as demais por meio de citação comparativa com ella, a escolha do typo deve recahir na alludida especie.

s) Tratando-se de auctores que adoptavam a "regra da primeira especie" como criterio para a fixação dos typos genericos, as primeiras especies por elles designadas devem ser tomadas como typos dos respectivos generos.

t) Em igualdade de condições, deve prevalecer a precedencia de pagina na escolha do typo.

Artigo 31 - A divisão de uma especie em duas ou mais especies restrictas está sujeita ás mesmas regras que a divisão de um genero. Mas um nome especifico que indubitavelmente se baseie em um erro de identificação, não pode ser retido para a especie mal determinada mesmo que ella seja mais tarde collocada em genero differente. Exemplo: *Taenia pectinata* Goeze, 1782 = *Cittotaenia pectinata* (Goeze), porém a especie erroneamente determinada por Zeder, 1800, como "*Taenia pectinata* Goeze" = *Andrya rhopalocephala* (Riehm); a especie de Zeder não recebe o nome de *Andrya pectinata* (Zeder).

Vide Opinião No. 13.

REJEIÇÃO DE NOMES

Artigo 32 - Um nome generico ou especifico, uma vez publicado, não pode ser rejeitado por motivo de falta de propriedade, nem mesmo por seu auctor. Exemplos: Nomes como *Polyodon, Apys, albus*, etc., uma vez publicados, não devem ser rejeitados pela allegação de que indicam caracteres contradictorios aos apresentados pelos animaes assim denominados.

Artigo 33 - Um nome deve ser rejeitado por causa de tautonymia, isto é, por serem identicos ao nome generico o nome especifico ou o subespecifico. Exemplos: *Trutta trutta, Apus apus apus*.

Artigo 34 - Um nome generico deve ser rejeitado como homonymo quando houver sido previamente usado para algum outro genero[1] de animaes. Exemplo: *Trichina* Owen, 1835, nematoide, é rejeitado como homonymo de *Trichina* Meigen, 1830, insecto.

Vide Opiniões Nos. 12, 29, 83.

CODIGO DE ETHICA

Sem se arrogar a arbitro de pontos de ethica geral, a Commissão está persuadida de que ha uma face deste assumpto sobre que ella é competente para falar, e, assim, a respeito suggere ao Congresso a adopção da seguinte resolução:

Considerando que - a experiencia tem demonstrado que auctores não raramente publicam por inadvertencia, como novas designações de generos ou especies, nomes que estão preoccupados, *e*

Considerando que - a experiencia tem demonstrado que outros auctores, ao descobrirem tal homonymia, têm publicado novos nomes para substituir aquelles homonymos,

Fica resolvido que - quando algum zoologo notar que o nome generico ou especifico publicado por qualquer auctor vivo como novo é realmente um homonymo e, pois, inaproveitavel á luz dos artigos 34 e 36 das Regras de Nomenclatura, sua acção no caso deve ser, do ponto de vista da ethica profissional, notificar ao alludido auctor os factos encontrados e dar-lhe ensejo amplo de propor um nome em substituição.

---

(1) Além de revistas e "nomenclatores" especiaes sobre varios grupos, as seguintes publicações são de grande utilidade para os auctores, porque indicam si um dado nome subgenerico, generico ou supergenerico, está preoccupado e, assim, sua consulta antes da creação de novos nomes evitará muita confusão e futura mudança de designações:

— C. D. Sherborn. Index animalium sive index nominum quae ab A. D. 1758, generibus et speciebus animalium imposita sunt. Societatibus eruditorum adjuvantibus a Carlo Davis Sherborn confectus. Sectio I a kalendis januariis, 1758, usque ad finem decembris, 1800. Cantabrigiae, 1902, 8°.

A continuação sobre 1801-1850 está agora apparecendo em partes.

— S. H. Scudder. Nomenclator zoologicus. Lista alphabetica de todos os nomes genericos que têm sido empregados por naturalistas para animaes recentes e fosseis desde os tempos mais remotos até o fim do anno de 1879. Em 2 partes: I. Lista supplementar. II. Index universal. Washington, 1882, 8°.

— C. O. Waterhouse. Index zoologicus. Lista alphabetica de generos e subgeneros propostos para uso em zoologia e citados no Zoological Record, 1880-1900 e 1901-1910, juntamente com outros nomes não incluidos no Nomenclator Zoologicus de S. H. Scudder. Compilado *** por Charles Owen Waterhouse e editado por David Sharp. Londres, 1902 e 1912, 8°.

— The Zoological Record, XXXVIII (*et seq.*). Contém citações de literatura zoologica relativa sobretudo ao anno de 1901 (*et seq.*). Londres, 1902 (*et seq.*), 8°. Indice de nomes de novos generos e subgeneros.

— Register zum zoologischer Anzeiger. Publicado por J. V. Carus, Annos 1-10(1878-1887), 11-15(1888-1892), 16-20(1893-1897), 21-25(1898-1902). Lipsia, 1889, 1893, 1899, 1903, 8°.

— Nomenclator animalium generum et subgenerum. Está agora (1926 *et seq.*) sendo publicado em partes pela Preussische Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

ARTIGO 35 - Um nome especifico deve ser rejeitado como homonymo quando tiver sido previamente usado para alguma outra especie ou subespecie do mesmo genero. Exemplo: *Taenia ovilla* Rivolta, 1878 (n. sp.) é rejeitado como homonymo de *T. ovilla* Gmelin, 1790.

Quando, por consequencia da união de dois generos, dois animaes differentes, que possuam o mesmo nome especifico ou subespecifico, são incluidos em um genero, o nome especifico ou subespecifico mais recente deve ser rejeitado como homonymo.

Nomes especificos da mesma origem e significação serão considerados homonymos si se distinguirem entre si apenas pelas seguintes differenças:

a) Uso de *ae*, *oe* e *e*, como *caeruleus*, *coeruleus*, *ceruleus*; *ei*, *i* e *y*, como *chiropus*, *cheiropus*; *c* e *k* como *microdon*, *mikrodon*.

b) Aspiração ou não aspiração de uma consoante, como *oxyryncus*, *oxyrhyncus*.

c) Presença ou ausencia de um *c* antes de *t*, como *autumnalis*, *auctumnalis*.

d) Consoante simples ou geminada: *litoralis*, *littoralis*.

e) Terminações *ensis* e *iensis* em nomes geographicos, como *timorensis*, *timoriensis*.

ARTIGO 36 - Homonymos rejeitados não podem ser usados. Synonymos rejeitados podem ser usados de novo no caso de restauração de grupos erroneamente suppressos. Exemplo: *Taenia giardi* Moniez, 1879 foi suppresso como synonymo de *Taenia ovilla* Rivolta, 1878; mais tarde foi descoberto que *Taenia ovilla* estava preoccupado (*Taenia ovilla* Gmelin, 1790). *Taenia ovilla*, 1878, é suppresso como homonymo e não pode ser mais usado; considerado "natimorto", não pode ser revivido mesmo que a especie seja collocada em outro genero (*Thysanosoma*). *Taenia giardi*, 1879, que foi suppresso como synonymo, torna-se valido em resultado da suppressão do homonymo *Taenia ovilla* Rivolta.

Recommendações - E' conveniente evitar a introducção de novos nomes genericos que differiram de nomes genericos já em uso pela terminação ou por uma pequena variação na orthographia que possa determinar confusão. Todavia, uma vez introduzidos, taes nomes não devem ser rejeitados por essa razão. Exemplos: *Picus*, *Pica*; *Polyodus*, *Polyodon*, *Polyodonta*, *Polyodontas*, *Polyodontus*; *Macrodon*, *Microdon*.

A mesma recommendação applica-se a novos nomes especificos em qualquer genero. Exemplos: *necator*, *necatrix*; *furcigera*, *furcifera*; *rhopalocephala*, *rhopaliocephala*.

Si dois ou mais adjectivos são derivados da radical de um nome geographico, não é aconselhavel usar mais de um delles como nome especifico no mesmo genero, mas, uma vez introduzidos, não se devem rejeitar por essa razão. Exemplos: *hispanus*, *hispanicus*; *moluccensis*, *moluccanus*; *sinensis*, *sinicus*, *chinensis*; *ceylonicus*, *zeylanicus*.

Esta recommendação applica-se tambem a outras palavras derivadas da mesma radical e distinctas entre si apenas pela terminação ou por uma simples mudança na orthographia.

SUSPENSÃO DAS REGRAS EM CERTOS CASOS

Fica resolvido:- Que, por este documento, se confere poder plenario á Commissão Internacional sobre Nomenclatura Zoologica, para, em nome deste Congresso, suspender as Regras quando applicadas em um caso dado qualquer, desde que, em seu julgamento, da estricta applicação das Regras resulte claramente maior confusão do que uniformidade, *com a condição*, todavia, de que, durante pelo menos um anno, se dê noticia em duas ou mais das seguintes publicações, Bulletin de la Societé Zoologique de France, Monitore Zoologico, Nature: Science (N. Y.) e Zoologischer Anzeiger; de que se está considerando a possibilidade da suspensão das Regras applicadas a tal caso, tornando-se assim possivel a zoologos, principalmente especialistas no grupo em jogo, apresentarem argumentos a favor ou contra a suspensão em estudo; e tambem *com a condição* de que a votação na Commissão resulte unanime em favor da suspensão; e finalmente *com a condição* de que, si da alludida votação resultar uma maioria de dois terços da Commissão completa, mas não unanimidade a favor da suspensão, a Commissão fique desde logo auctorizada a submetter os factos á consideração do primeiro Congresso Internacional;

Fica resolvido:- Que, no caso de uma questão ser affecta ao Congresso, nas condições acima descriptas, com uma maioria de dois terços da Commissão em favor da suspensão, mas sem um voto unanime, caberá ao Presidente da Secção de Nomenclatura nomear um conselho especial de 3 membros, dos quaes dois pertencentes á Commissão (um que tenha votado de um modo e outro que o tenha feito de modo opposto na questão) e o terceiro um ex-membro da Commissão que não tenha expresso em publico sua opinião sobre o caso; e que este conselho especial deverá rever os factos apresentados e seu relatorio, adoptado por maioria ou por unanimidade, será final e inappellavel no que concerne ao Congresso;

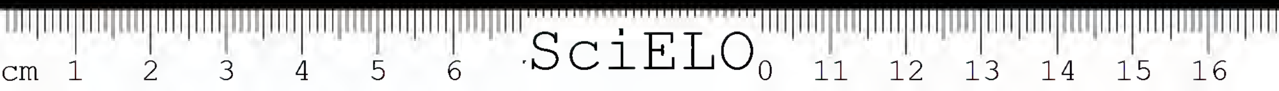
Fica resolvido:- Que a auctoridade precitada trate, na primeira occasião e especialmente, de questões de nomes de phases larvarias e da transferencia de nomes de um genero para outro; e

Fica resolvido:- Que o Congresso não somente approva inteiramente o plano que foi iniciado pela Commissão, de tratar com comitês especiaes a respeito de determinados grupos em qualquer caso, mas ainda auctoriza e instrue a Commissão a continuar e desenvolver essa orientação.

Vide Opiniões Nos. 76, 80, 82, 89, 90.

APPENDICE

A. - E' muito desejavel que a proposta de cada novo grupo systematico seja acompanhada de uma diagnose, tanto individual quanto differencial, do grupo, em inglês, francês, alemão, italiano, ou latim.



Esta diagnose deve declinar o nome do museu em que o exemplar typo foi depositado e dar o numero (catalogo do museu) do referido exemplar.

Recommenda-se que nas descripções publicadas de uma nova especie ou subespecie, se designe e rotule como *typo* apenas um exemplar, ficando como *paratypos* os demais exemplares examinados pelo auctor na mesma occasião.

B. - Em publicações feitas em outras linguas que não o inglês, francês, alemão, italiano, ou latim, é desejavel que a explicação das gravuras appareça traduzida em uma destas linguas.

C. - O systema metrico de pesos e medidas e o thermometro centigrado de Celsius são adoptados como padrão. O *micron* (0,001 mm.), representado pela letra grega μ, é adoptado como unidade de medida em trabalhos de microscopio.

D. - A indicação de augmento ou de reducção, tão necessaria á comprehensão de uma illustração, deve ser expressa antes em algarismos do que pela menção do systema de lentes usado.

E. - A indicação de augmento ou reducção de um objecto é geralmente linear. Usa-se o signal de multiplicação para augmento e o de fracção para reducção. Exemplos: × 50 indica que o objecto está augmentado 50 vezes. $^1/_{50}$ significa que elle está reduzido 50 vezes.

Si se deseja especificar que o augmento é em linha, superficie, ou massa, deve-se representar assim: × 50^1 para indicar augmento numa dimensão; × 50^2 para indicar augmento em area; × 50^3 para indicar augmento em volume.

F. - *Transliteração de palavras gregas* - A seguinte lista indica a maneira por que se devem transliterar palavras gregas:

	ε	= e	(ὑάλεος) Hyalea, e não Hyalaea
	η	= e	(πειρήνη) Pirena, e não Pirina
final	η	= a	(πειρήνη) Pirena, e não Pirene
	θ	= th	(τηθύς) Tethys, e não Tetys
	ι	= i	(βαλίος) Balia, e não Balea
	κ	= c	(ἱπποκρήνη) Hippocrena, e não Hippochrenes
	ξ	= x	(ξένος) Xenus, Xenophora
	ρ	= r	(πτερὸν) Pterum
	υ	= y	(ὑβός) Hybolithus, e não Hibolites
	αι	= ae	(λιμναῖος) Limnaea, e não Limnea
	αυ	= au	(γλαυκός) Glaucus
	ει	= i	(χεῖλος) Chilostomum, e não Cheilostoma
	ευ	= eu	(εὖρος) Eurus
	ῳ, οι	= oe	(οἰκέω) Dioeca, Dendroeca, e não Dioica, Dendroica
final	ον	= um	(ἐφίππιον) Ephippium, e não Ephippion
final	ος	= us	(ὀμφαλός) Euomphalus, e não Euomphalos
	ου	= u	(λουτήριον) Luterium, e não Loterium
	γγ	= ng	(ἀγγαρεία) Angaria, e não Aggaria
	γχ	= nch	(ἀγχίστομον) Anchistomum, e não Angistoma
	γκ	= nc	(ἀγκιστροδον) Ancistrodon, e não Agkistrodon
	ῥ	= rh	(ῥέα) Rhea
	ἑ	= he	(ἑρμαία) Hermaea, e não Ermaea

G. - *Transliteração de nomes geographicos e proprios* - Os nomes geographicos de países que empregam caracteres latinos se devem escrever com a orthographia da região em que se originam.

Os seguintes paragraphos applicam-se somente aos nomes geographicos de países que não têm alphabeto verdadeiro ou usam letras differentes das latinas.

Nomes de logares, estabelecidos por longo uso, conservam sua orthographia usual. Exemplos: *Argel*, *Moscou*.

1. As vogaes *a*, *e*, *i* e o pronunciam-se como em francês, italiano, espanhol [e português], ou alemão. A letra *e* nunca é muda.

2. O som francês *u* é representado por *ü* com dierese, como em alemão.

3. O som francês *ou* é representado por *u*, como em italiano, espanhol [ou português], alemão, etc.

4. O som francês *eu* é representado por *oe*, pronunciado como na palavra francesa *oeil*.

5. O som longo de uma vogal é indicado por um accento circumflexo; o som interrompido é indicado por um apostropho.

6. As consoantes *b*, *d*, *f*, *j*, *k*, *l*, *m*, *n*, *p*, *q*, *r*, *t*, *v*, e *z* são pronunciadas como em francês.

7. As letras *g* e *s* têm sempre o som duro, como nas vogaes francesas *gamelle* e *sirop*.

8. O som representado em francês por *ch* é designado por *sh*. Exemplos: *Shérif*, *Kashgar*.

9. *Kh* representa a guttural aspera e *gh* a guttural branda dos arabes.

10. *Ph* representa o som com que termina a palavra inglesa *path* (ϑ em grego). *Dh* representa o som inicial do vocabulo inglês *those* (ζ em grego).

11. Fora de tal emprego (9 e 10) da letra *h* modificando a que a precede, *h* é sempre aspirado; o apostropho, por conseguinte, não se usa jamais antes de uma palavra que comece por *h*.

12. A semivogal representada por *y* é pronunciada como em *yole*.

13. A semivogal *w* é pronunciada como no vocabulo inglês *William*.

14. Os sons duplos *dj*, *tch*, *ts*, etc., indicam-se por letras correspondentes aos sons que os compõem. Exemplo: *Matshim*.

15. O *ñ* é pronunciado *gn* como no francês *seigneur* [*nh* em português].

16. As letras *x*, *c* e *q* não se usam por serem duplicatas de outras letras que representam os mesmos sons; mas *q* pode servir para indicar o arabe *qaf* e a aspirada branda pode ser empregada para representar o arabe *aïn*.

Deve-se tentar indicar, tão exactamente quanto possivel, por meio das letras citadas acima, a pronuncia local, sem procurar dar uma representação completa de todos os sons que se ouvem.

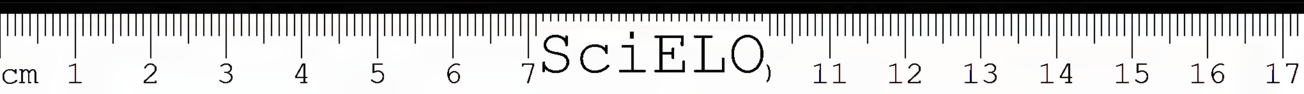
NOTA DO TRADUCTOR: - Algumas destas indicações dirigem-se naturalmente aos povos de lingua inglesa.

RESUMOS DE OPINIÕES EMITTIDAS

1. *Significação da palavra "indicação" no Art. 25a.* - A palavra *"indicação"* no Art. 25a. deve ser interpretada como segue:

A. Em relação a nomes *especificos* corresponde a uma *"indicação"*: (1) uma citação bibliographica, ou (2) uma gravura publicada (illustração), ou (3) uma citação definida de um nome anterior para o qual se propõe uma nova designação.

B. Em relação a nomes *genericos*: (1) uma citação bibliographica, ou (2) uma citação definida de um nome anterior para o qual se propõe uma nova designação, ou (3) a citação ou designação de uma especie typo.



Em caso algum se deve considerar a palavra "*indicação*" como correspondente a rotulos de museu, exemplares de museu, ou nomes vernaculos.

2. *Natureza de um nome systematico.* - A Commissão é de opinião unanime que um *nome*, no sentido do Codigo, corresponde á designação pela qual são conhecidos os objectos reaes. Em outras palavras, nós designamos os proprios objectos, e não a nossa concepção de taes objectos. Nomes baseados em formas hypotheticas, por conseguinte, não têm significação em nomenclatura e de nenhum modo merecem consideração á luz da Lei de Prioridade.

Exemplos: *Pithecanthropus* Haeckel, 1866, sendo o nome de um genero hypothetico, não tem significação á luz do Codigo e, portanto, não invalida *Pithecanthropus* Dubois, 1894; *Gigantopora minuta* Loose, 1907, n.g., n.sp., não tem significação alguma á luz do Codigo, porquanto é considerado como nome de uma unidade phantastica, baseada em nenhum objecto real.

3. *Situação de publicações datadas de* 1758. - A decima edição do "Systema Naturae" de Linneu appareceu muito cedo no anno de 1758 e, por motivos praticos, pode-se presumir que esta data seja: primeiro de janeiro de 1758. Assim, quaesquer outras publicações zoologicas, datadas de 1758, se podem presumir como tendo apparecido depois do dia primeiro de janeiro. No que respeita á data, todas essas publicações podem, portanto, ser consideradas merecedoras de consideração debaixo da Lei de Prioridade.

4. *Situação de certos nomes publicados como manuscriptos.* - Nomes manuscriptos têm entrada em nomenclatura quando impressos em ligação com as disposições do Art. 25, e a questão de sua validez não é influenciada pelo facto de taes nomes serem acceitos ou rejeitados pelo auctor responsavel por sua publicação.

5. *Situação de certos nomes pre-linneanos reimpressos após* 1757. - Um nome pre-linneano, inelegivel por causa de sua publicação antes de 1758, não se torna elegivel simplesmente por ser citado ou reimpresso, com sua diagnose original, depois de 1757. Para tornarem-se elegiveis sob o Codigo, taes nomes devem ser reforçados por adopção ou acceitação por parte do auctor que publica a reimpressão. Exemplos: A citação, posterior a 1757, de uma referencia bibliographica sobre um trabalho anterior a 1758 não firma nomes technicos por ventura contidos na alludida referencia; a situação synonymica de nomes pre-linneanos, como occorre na decima edição do "Systema Naturae" de Linneu, não firma taes nomes sob o Codigo.

6. *No caso de um genero A Linneu,* 1758, *com duas especies Ab e Ac.* - Quando um auctor subsequente divide o genero A, especies Ab e Ac, deixando o genero A apenas com a especie Ab e o genero C, monotypico, com a especie Cc, esse auctor deve ser considerado como tendo fixado o typo do genero A (Vide Artigo 30).

7. *Sobre a interpretação da expressão "n.g., n.sp." á luz do Artigo* 30(*a*) - A expressão "n.g., n.sp." usada na publicação de um novo genero, do qual nenhuma outra especie é aliás designada como genotypo, deve ser acceita como designação, á luz do Artigo 30(a).

8. *Sobre a retenção de ii ou i em nomes especificos patronymicos sob o Artigo* 14(*c*) *e Artigo* 19. - Patronymicos especificos, publicados originalmente com a terminação *ii* (como *schrankii*, *ebbesbornii*) devem, de accordo com o Artigo 19, ser conservados em sua forma original, a despeito do Artigo 14(c) que estabelece que elles deviam ter sido formados apenas com um *i*.

9. *Applicação do nome de um genero composto a um dos seus elementos que necessite de nome.* - Depende de varias circunstancias a decisão sobre si o nome de um genero composto, quando formado inteiramente de generos mais velhos, é applicavel

um dos seus elementos componentes que necessite de um nome. Ha circunstancias sob que tal nome pode ser usado, outras sob que não o pode ser (Art. 30).

10. *Designação de genotypos para generos publicados com identicos limites.* - Si dois generos com os mesmos limites são formados independentemente por differentes auctores, sem designação de genotypos, qualquer auctor subsequente pode designar os genotypos (Art. 30g), e, si os typos designados não são identicos especificamente, os dois nomes genericos podem (em igualdade de condições) ser usados para generos restrictos que contenham os alludidos typos (Art. 25).

11. *Designação de genotypos por Latreille,* 1810. - A "Table des genres avec l'indication de l'espèce que leur sert de type", in "Considérations générales" de Latreille (1810), deve ser acceita como designação de typos dos generos nella incluidos (Art. 30).

12. STEPHANOCEROS FIMBRIATUS (*Goldfuss,* 1820) vs. STEPHANOCEROS EICHHORNII *Ehrenberg,* 1832. - O nome generico *Stephanoceros,* 1832, deve ser usado de preferencia a *Coronella,* 1820 (preoccupado, 1768); o nome especifico *fimbriatus,* 1820 tem precedencia a *eichhornii,* 1832, que é considerado (Ehrenberg, 1832 b, 125, e 1838 a, 400-401) como redenominação de *fimbriatus,* 1820. Ehrenberg teve razão em rejeitar *Coronella,* 1820, mas errou em rejeitar *fimbriatus,* 1820, não havendo razão apparente para perpetuar o seu erro.

13. *Nome especifico do caranguejo da areia.* - O nome pre-linneano (1743) *arenarius* de Catesby não é aproveitavel á luz do Codigo, embora tenha sido "reimpresso" em 1771; *quadratus* 1793 affirma-se que está preoccupado; *albicans* 1802, sendo o nome especifico immediato na lista, torna-se valido diante dos argumentos apresentados.

14. *Especie typo de* ETHEOSTOMA *Rafinesque,* 1819. - A designação de *E. blennioides* Rafinesque, 1819, como typo de *Etheostoma* Rafinesque, 1819, conforme fez Agassiz em 1854, não é invalidada, por ter Agassiz usado, como base para sua diagnose generica, caracteres tirados de uma erronea determinação especifica de 1839. Não somente Agassiz affirmou claramente que "*Eth. blennioides* Raf." era typo de "*Etheostoma* Raf.", mas ainda, mesmo que se tome em consideração a questão da identificação erronea de *E. blennioides* por Kirtland, a conclusão a tirar é que esta identificação erronea não excluiu deste nome especifico os exemplares originaes de *E. blennioides*; pelo contrario, o nome usado por Kirtland, 1839, ainda incluia os exemplares typo; retirando-se agora os exemplares erroneamente determinados em 1839, os quaes pelo Artigo 30e (*a*) são excluidos de consideração na designação de genotypo, permanecem os exemplares typo originaes de 1819, os quaes, diante dos argumentos apresentados, representam o typo do genero.

15. CRASOEDACUSTA SOWERBII *Lankester,* 1880, *n.g., n.sp.,* vs. LIMONOCODIUM VICTORIA *Allman,* 1880, *n.g., n.sp.,* MEDUSA *de agua doce.* - *Craspedacusta sowerbii* Lankester, 17 de junho de 1880, tem nitida prioridade sobre *Limnocodium victoria* Allman, 24 de junho de 1880. A apresentação de um trabalho a uma sociedade scientifica não constitue publicação no sentido do Codigo. A Commissão não tem auctoridade para sanccionar uso que infrinja as disposições do Codigo. [Cf. Capitulo "Suspensão das Regras", p. 249].

16. *Situação de nomes especificos pre-binominaes* (*publicados antes de* 1758) *sob o Art. 30d.* - Ao se decidir sobre a presença de um caso de absoluta tautonymia (sob o Art. 30d), deve-se acceitar a citação, em synonymia, de um nome especifico prebinominal claro, como prova de sua conformidade com as exigencias do Art. 30d. Exemplos: *Equus caballus* (*Equus* citado em synonymia no sentido do "cavallo"), *Alca torda* (*Alca* citado em synonymia no sentido da "Alca").



17. *Devem acceitar-se os generos de Weber*, 1795? - O Nomenclator Entomologicus de Weber, 1795, satisfaz os requisitos do Artigo 25 e, pois, devem ser acceitos os generos nelle incluidos desde que individualmente estejam de accordo com as condições do Codigo.

18. *Typo de* HYDRUS *Schneider*, 1799. - De accordo com os argumentos, *caspius* Schneider, syn. *hydrus* Pallas, é o typo de *Hydrus* Schneider. (Art. 30d).

19. PLESIOPS vs. PHAROPTERYX. - Diante dos dados, não está claro si, por sua natureza, este caso é de nomenclatura ou de zoologia. Tanto quanto a evidencia permitte julgar, a pergunta sobre si Rüppell errou em acceitar *Plesiops* como identico a *Pharopteryx* deve ser respondida do ponto de vista systematico. Si, em face de nossa actual concepção dos limites genericos, Rüppell tinha razão, não ha motivo apparente para não se acceitar a sua decisão no terreno da nomenclatura.

20. *Devem-se acceitar os generos de Gronow*, 1763? - Gronow, 1763, é binario, embora não consistentemente binominal. O Artigo 25 requere que um auctor seja binario e o Artigo 2 requere que os nomes genericos sejam uninominaes. A' luz destes Artigos, os generos de Gronow devem ser acceitos como preenchendo as condições prescriptas pelo Codigo para o competente aproveitamento de um nome [Cf. Opinião 89].

21. *Devem-se acceitar os generos de Klein*, 1744, *reimpressos por Walbaum*, 1792? - Quando Walbaum em 1792 reimprimiu em forma condensada (mas não acceitou) os generos de Klein de 1744, elle com esse acto não deu aos generos de Klein situação alguma em nomenclatura e, por conseguinte, os generos de Klein não se tornam aproveitaveis á luz do Codigo presente, pelo facto de terem sido citados por Walbaum.

22. CERATICTHYS vs. CLIOLA. - Quaesquer que tenham sido as intenções originaes de Baird, elle e Girard publicaram inicialmente (1853) *Ceratichthys* como um genero monotypico, descrevendo o genotypo (*C. vigilax*) e não dando indicação alguma de que não pretendiam com isso publicar um "n.g., n.sp.". Diante do Artigo 30c, *vigilax* é o typo de *Ceraticthys*.

23. ASPRO vs. CHEILODIPTERUS ou AMBASSIS. - Diante dos argumentos apresentados, *Centropomus macrodon* pode ser considerado typo de *Aspro* 1802, supprimindo-se este ultimo como synonymo de *Cheilodipterus* e salvando-se, assim, *Ambassis*.

24. ANTENNARIUS *Commerson*, 1798, *e Cuvier*, 1817, vs. HISTRIO *Fischer*, 1813. - *Antennarius* Commerson é um nome uninominal (Art. 2) de um auctor que usou uma nomenclatura binaria (embora não binominal) (Art. 25). Adquiriu valor nomenclatorial em virtude de sua publicação por Lacépède em 1798 e deve trazer esta indicação ao invés de Cuvier, 1817. Portanto, não é necessario supprimil-o em beneficio de *Histrio*, 1813. [Cf. Opinião 89].

25. DAMESIELLA *Tornquist*, 1899, vs. DAMESELLA *Walcott*, 1905. - Diante das Recommendações do Artigo 36, não é necessario rejeitar *Damesella*, 1905, em virtude da existencia de *Damesiella*, 1898 (1899?).

26. CYPSILURUS vs. CYPSELURUS. - Em vista do numero de erros typographicos em Swainson, 1838 e 1839, a Commissão é de opinião que *Cypsilurus* é um erro typographico evidente que deve ser correcto para *Cypselurus*.

27. RUPPELIA *e* RUPELLIA vs. RÜPPELLIA. - Desde que é evidente um erro typographico, *Ruppelia* e *Rupellia* devem ser correctos para *Rüppellia*.

28. *Deve-se dar prioridade á "Nouvelle Classification" de Meigen*, 1800, *em relação á sua "Versuch" de* 1803? - Os nomes genericos contidos na "Nouvelle Classification" de Meigen, 1800, devem ter precedencia aos usados em sua "Versuch" 180

em todos os casos em que os primeiros forem considerados validos sob o Codigo Internacional.

29. Pachynathus vs. Pachygnathus. - Baseada no argumento constante da Opinião 26 e na existencia do nome anterior *Pachygnathus*, 1834, Arach., a Commissão é de parecer que *Pachygnathus* Swainson, 1839 deve ser suppresso.

30. *Generos de aves de Swainson*, 1827. - Os generos de aves, publicados por Swainson no Philosophical Magazine de 1827, são monotypicos e, de accordo com o Artigo 30c, as especies ali mencionadas são typos dos seus respectivos generos. Por consequencia, estes typos devem ter precedencia aos typos de Swainson designados mais tarde, no Zoological Journal de 1827.

31. Columbina vs. Chaemepelia. - Em 1840 Gray designou *Columba passerina* Linneu como typo de *Columbina* Spix. Como esta especie não é uma das originaes de *Columbina* Spix, a designação do typo por Gray não é valida e *Columbina*(*) permanece sem um typo designado. O typo valido de *Chaemepelia* Swainson é *Columba passerina* Linneu, designada por Gray em 1841.

[(*) Nota escripta por Stejneger (membro da Commissão): ao ser redigida a Opinião 31, o auctor não tinha visto a segunda edição dos Generos de Aves de Gray, publicada em 1841, nem os documentos apresentados na occasião tratavam claramente da questão e, porisso, lhe escapou que *Columbina strepitans* Spix fora designada por Gray em 1841, p.75, como typo de *Columbina*. Este acto de Gray é indubitavelmente valido e, portanto, o typo de *Columbina* é *C. strepitans* Spix. Em vista deste facto trazido ao conhecimento da Commissão pelo Sr. W. E. Clyde Todd, a Opinião 31 fica aqui mudada de accordo com elle e será submettida aos membros para a devida approvação.

Allen, 1911, Science, 336, designou *griseola* Spix como typo de *Columbina* Spix, 1825].

32. *Typo do genero* Sphex. - De accordo com os argumentos apresentados, *sabulosa* é o typo de *Sphex* Linneu, 1758.

33. *Typo do genero* Rutilus *Rafinesque*, 1820. - *Cyprinus rutilus* é o typo de *Rutilus* Rafinesque, 1820. *Rutilus plargyrus* é o typo de *Plargyrus* Rafinesque, 1820.

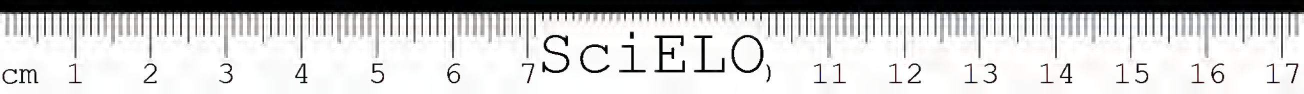
34. Æshna vs. Æschna. - Desde que a publicação original não evidencia a derivação da palavra, a graphia original *Æshna* deve ser conservada.

35. *Typos de generos de auctores binarios mas não binominaes*. - Na determinação do typo de um genero, a selecção deve limitar-se ás especies incluidas no nome generico por occasião de sua publicação original, tivessem ou não ellas sido designadas binominalmente. Si, todavia, um nome generico é proposto distinctamente como substituto para outro nome generico anterior, as especies deste devem ser tomadas em consideração.

36. *Emenda de* Trioxocera, Dioxocera *e* Pentoxocera. - A Commissão é de parecer que a publicação original de *Trioxocera*, *Dioxocera* e *Pentoxocera* evidencia a presença de um erro de transcripção (ou transliteração) e que estes nomes devem ser emendados para *Triozocera*, *Diozocera* e *Pentozocera*.

37. *Devem acceitar-se os generos da "Ornithologia" de Brisson*, 1760? - Os nomes genericos de aves usados por Brisson (1760) são aproveitaveis sob o Codigo.

38. *Situação dos nomes latinos em Tunstall*, 1771. - Os nomes latinos usados na Ornithologia Britannica de Tunstall, 1761, são aproveitaveis desde que sejam identifi-



caveis por meio das referencias que fez de bibliographia, paginas e illustrações, ou pelas citações de nomes ingleses de Pennant, 1768, ou de nomes franceses de Brisson, 1760.

39. *Situação dos nomes latinos em Cuvier,* 1800. - Os nomes latinos dos quadros systematicos usados por Cuvier, 1800 (Leçons d'anatomie comparée), são aproveitaveis desde que sejam identificaveis por meio das citações bibliographicas constantes da pagina xix da Introducção.

40. SALMO ERIOX *vs.* S. TRUTTA *e* S. FARIO; ENIOCHUS ACUMINATUS *vs.* H. MACROLEPIDOTUS. - Diante dos argumentos apresentados, não é necessario substituir *fario* ou *trutta* por *eriox;* a selecção de *macrolepidotus* por Cuvier (1817) tem precedencia sobre a selecção de *acuminatus* por Jordan & Seale, 1908.

41. ATHLENNES *vs.* ABLENNES. - Desde que a publicação original revela um evidente *lapsus calami,* o nome *Athlennes* deve ser correcto para *Ablennes.*

42. *Typo de* CARAPUS *Rafinesque,* 1810. - *Carapus* Rafinesque, 1810, é monotypico, typo *Gymnotus acus* Linneu.

43. *Situação de generos cujas especies typo estão citadas sem descripção addicional.* - Os caracteres attribuidos a *Teleogmus, Isoplata, Alloderma,* e *Aphobetoideus* abrangem os generos e as especies typo, e os nomes genericos especificos respectivos estão publicados no sentido do Codigo.

44. LEPTOCEPHALUS *vs.* CONGER. - *Leptocephalus* Gronovius, 1763, e Gmelin, 1789, typo *morrisii,* tem precedencia a qualquer nome generico posterior, pelo qual se tenha designado a phase adulta deste animal. [Cf. Opinião 89].

45. *Typo de* SYNGNATHUS *Linneu,* 1758. - Até onde se pode julgar pelos argumentos apresentados, o typo de *Syngnathus* Linneu, 1758, não foi jamais claramente designado e não ha objecção a que se designe como tal a especie *acus* Linneu, em observancia ao costume e conveniencia geraes.

46. *Situação de generos publicados originalmente sem designação clara de alguma especie.* - Em generos publicados sem menção nominal de qualquer especie, nenhuma especie é aproveitavel como genotypo, a menos que possa ser reconhecida pela publicação generica original; si apenas uma especie está em jogo, a descripção generica é equivalente á publicação de "*X-us albus,* n.g., n.sp.,"; si varias especies são referidas, mas não mencionadas pelo nome, uma dellas deve ser tomada como typo; si (como em *Aclastus* Foerster, 1868) na publicação original do genero não ha evidencia de quantas especies estão em jogo, esse genero contém todas as especies do mundo que possam caber na descripção generica conforme foi publicado originalmente, e a primeira especie publicada em ligação com o genero (como *Aclastus rufipes* Ashmead, 1902) *ipso facto* torna-se typo.

47. CARCHARIAS, CARCHARHINUS *e* CARCHARODON. - *Carcharias* Rafinesque, 1810, é monotypico, typo *Carcharias taurus* Rafinesque.

48. *Situação de certos nomes genericos de aves publicados por Brehm in Isis,* 1828 *e* 1830. - Desde que os nomes de Brehm, 1828 e 1830 dependem exclusivamente de designações vernaculas, elles são *nomina nuda* e não merecem citação.

49. SIPHONOPHORA ASCLEPIADIFOLII *vs.* NECTAROPHORA ASCLEPIADIS. - Diante dos dados apresentados, *asclepiadifolii* Thomas, 1879, é preferivel a *asclepiadis* Cowen, 1895.

50. APHIS AQUILEGIAE FLAVA *vs.* APHIS TRIRHODA. - Desde que o nome *Aphis aquilegiae flava* Kittell, 1827, é multinominal e inaproveitavel sob o Codigo, *Aphis trirhoda* Walker, 1849, é o nome correcto para esta especie.

51. *Devem acceitar-se os nomes do Museum Calonnianum*, 1797? - O Museum Calonnianum, 1797, não é acceitavel como base para qualquer trabalho nomenclatorial.

52. Semotilus corporalis vs. Semotilus bullaris. - Diante dos argumentos apresentados, *corporalis* tem prioridade sobre *bullaris*. Não é possivel á Commissão exarar uma opinião sobre a pergunta: Que constitue uma descripção adequada? A citação da localidade typo de uma especie não é sufficiente para estabelecer um nome á luz do Art. 25a do Codigo. Si são apresentados caracteres especificos em additamento á localidade typo, esta se torna uma parte da descripção e deve ser considerada como um elemento importante na determinação da identidade da especie.

53. Halicampus koilomatodon vs. Halicampus grayi. - O nome especifico *grayi* Kaup, 1856 tem prioridade sobre *koilomatodon* Bleeker, "cerca de 1865".

54. Phoxinus *Rafinesque* vs. Phoxinus *Agassiz*. - Os generos *Dobula*, *Phoxinus* e *Alburnus* foram creação de Rafinesque, 1820. Jordan & Evermann, 1896, allegam que *Phoxinus* Agassiz, 1835, é identico a *Phoxinus* Rafinesque 1820, e, portanto, proclamam ter reconhecido *Phoxinus* 1820. Esta allegação deve ser considerada correcta até que se prove o contrario e *Cyprinus phoxinus* fica como typo de *Phoxinus* 1820 e de *Phoxinus* 1835. Si se allega que *Alburnus* 1820 é identico a *Alburnus* 1840, *Cyprinus alburnus* torna-se typo de *Alburnus* 1820.

55. *Typo do genero* Ondatra *Link*. - Diante dos argumentos apresentados, *zibethicus* é o typo de *Ondatra* Link.

56. *Typo de* Filaria *Mueller*, 1787. - Mueller (1787, pp. 64 e 70) cita, visivelmente por erro, a mesma gravura (estampa 9, fig. 1) de Redi para *Ascaris renalis* Gmel. e *Filaria martis* de Gmel.. Gmelin (1790a, pp.3032 e 3040) conservou este lapso. Rudolphi (1809a, p.69) reconheceu e corrigiu o erro e, desde então, *Filaria martis* tem sido consistentemente distinguida de *Ascaris renalis*, não havendo actualmente motivo para não se reconhecer a correcção do lapso de Mueller por parte de Rudolphi. Assim sendo, *F. martis* fica como typo de *Filaria* e *Filaria* não é mudada para *Dioctophyme*, *Dioctophyma* ou *Eustrongylus*.

57. *Nomes oriundos do "Iter Palaestinum" de Hasselquist*, 1757, *e da traducção de* 1762, *são insustentaveis*. - O "Iter Palaestinum" foi publicado antes de 1758 e editado, em relação á sua nomenclatura, por Linneu. A traducção alemã por Gadebusch, publicada em 1762, não confere validez aos nomes publicados na edição original de 1757.

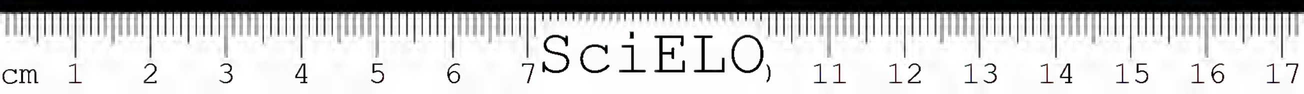
58. Esox, Lucius *e* Belone. - "Considerando-se com severidade", nem Rafinesque (1810, Caratteri, p.59), nem Cuvier (1817, p.183) designou o typo de *Esox* Linneu, 1758; Jordan & Gilbert, 1882, p.352, escolheram *Esox lucius* Linneu como typo de *Esox*.

59. *Data de* Amphimerus. - O nome do trematoide *Amphimerus* Barker não data do apparecimento das separatas ("tirés à part"), mas do tempo da publicação dos Studies from the Zoological Laboratory, The University of Nebraska, No. 103.

60. Salmo iridia vs. Salmo irideus. - *Salmo iridia* é evidentemente um *lapsus calami* ou um erro typographico e pode ser emendado para *Salmo irideus*.

61. *Emenda de* Chaemepelia *para* Chamaepelia. - A palavra *Chaemepelia* Swainson, 1827, deve ser emendada para *Chamaepelia*.

62. *Especies typo de outros generos não estão excluidas de consideração na selecção do typo de um genero*. - Desde que o Artigo 30 não exclue de consideração as especies typo de outros generos na selecção do typo de um genero dado, as seguintes especies typo, designados por Gray, são, em face dos dados apresentados, os typos validos dos seguintes generos: *Fulmarus*, typo *Procellaria glacialis*; *Thalasseus*, typo *Sterna*



cantiaca; Herodias, typo *Ardea garzetta; Catharista*, typo *Vultur aura; Morphnus*, typo *Falco urubitinga; Helinaia*, typo *Motacilla vermivora.*

63. Leuciscus hakuensis vs. Leuciscus hakonensis. - *Leuciscus hakuensis* deve ser correcto para *Leuciscus hakonensis*, em virtude de ter occorrido com o primeiro, seja um *lapsus calami*, seja um erro typographico.

64. *Letras seriadas taes como a, b, c, etc. não são acceitaveis como nomes especificos.* - Letras seriadas como *a, b, c*, etc., não se devem considerar como verdadeiros nomes especificos.

65. *Caso de um genero bascado em especie erroneamente determinada.* - Si um auctor designa uma certa especie como genotypo, deve-se presumir que sua determinação da especie esteja correcta; si se apresenta um caso em que pareça que um auctor baseou o seu genero sobre determinados exemplares, ao invés de o fazer sobre uma especie, seria bom submetter-se o caso, com todos os pormenores, á Commissão. Presentemente é difficil estabelecer-se uma regra geral para taes casos.

66. *Nomes de Nematoideos e Gordiaceos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes de Nematoda e Gordiacea são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Ancylostoma, Ascaris, Dracunculus, Gnathostoma, Necator, Strongyloides, Trichostrongylus, Gordius*, e *Paragordius.*

67. *Cento e dois nomes de Aves collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os cento e dois nomes seguintes de aves são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Acryllium, Æchmophorus, Ægithina, Ægotheles, Æpyornis, Aix, Alauda, Anas, Apaloderma, Aptenodytes, Apteryx, Aramus, Ardea, Astrapia, Asturina, Aulacorhynchus, Balaeniceps, Batrachostomus, Brotogeris, Bubo, Burhinus, Cairina, Campephaga, Capito, Cathartes, Centrocercus, Cephalopterus, Cereopsis, Chauna, Chrysolophus, Cicinnurus, Circaëtus, Clamator, Coccyzus, Coereba, Colaptes, Colluricincla, Coturnix, Crotophaga, Diomedea, Dromas, Ectopistes, Egretta, Elanus, Eurylaimus, Eurynorhynchus, Eurypyga, Fulmarus, Gallinago, Gampsonyx, Goura, Gypaëtus, Haematopus, Haliaeetus, Haliastur, Heliornis, Ibidorhyncha, Jynx, Lanius, Leistes, Manucodia, Musophaga, Neophron, Notornis, Numida, Nictea, Œdicnemus, Opisthocomus, Oriolus, Pachycephala, Pandion, Parotia, Parus, Pezoporus, Phaëthon, Pharomachrus, Phoenicopterus, Platalea, Platycercus, Polyplectron, Porzana, Psittacus, Psophia, Pteroglossus, Ptiloris, Rallus, Recurvirostra, Sericulus, Sitta, Sphenorynchus, Spindalis, Strigops, Struthio, Sturnella, Sturnus, Surnia, Syrrhaptes, Tachyphonus, Thamnophilus, Trichoglossus, Uratelornis, Vireo.*

68. *Especies typo de* Pleuronectes *Linneu*, 1758. - Fleming, 1828, 196, não designa o typo de *Pleuronectes.*

69. *Especie typo de* Sparus *Linneu*, 1758. - Fleming, 1828, 211, não designa o typo de *Sparus.*

70. *Caso de* Libellula americana *L.*, 1758, vs. Libellula americanus *Drury*, 1773. - Em virtude de ser *Libellula americanus* Drury, 1773 um *lapsus calami* evidente em logar de *Gryllus americanus*, este lapso deve ser correcto e o nome especifico no caso, *americanus* 1773, não está invalidado por *Libellula americana* 1758.

71. *Interpretação da expressão "Especies typicas" na Synopsis de Westwood*, 1840. - As especies citadas por Westwood, 1840 ("An Introduction to the Modern Classification of Insects", Vol. 2, Synopsis, paginação separada, pags. 1 a 158), como "especies typicas", devem ser acceitas como designações claras de genotypos para os generos respectivos. Quanto ao facto de uma determinada especie considerada representar ou não o genotypo valido, isto depende de dois factores: *primeiro*, de si a es-

pecie era aproveitavel como genotypo; *segundo*, de si a sua designação em 1840 era precedida por qualquer outra denominação.

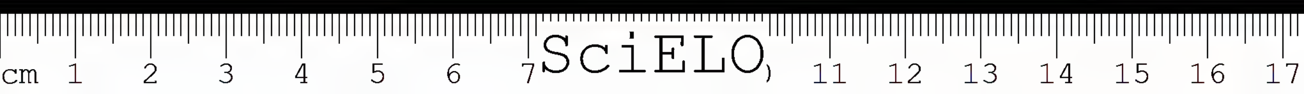
72. *Formulas zoologicas de Herrera.* - As designações de animaes de accordo com o systema proposto por Herrera, no caso submettido a consideração, são formulas e não nomes. Portanto, ellas não têm valor em nomenclatura e, assim, não estão sujeitas a consideração sob a Lei de Prioridade. Nenhum auctor é obrigado a citar essas designações em qualquer quadro de synonymia, indice ou outras listas de nomes.

73. *Cinco nomes genericos de Crinoideos, oitenta e seis nomes genericos de Crustaceos e oito nomes genericos de Acarinos, collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: CRINOIDEA: *Antedon, Bathycrinus, Holopus, Metacrinus, Rhizocrinus.* CRUSTACEA: *Acanthocyclus, Actaea, Actaeomorpha, Actumnus, Arcania, Archias, Arenaeus, Atergatis, Atergatopsis, Banareia, Bathynectes, Bellia, Benthochascon, Caphyra, Carpilius, Carpilodes, Carpoporus, Carupa, Chlorodopsis, Coenophthalmus, Corystoides, Cryptocnemus, Cyclodius, Cymo, Dacryopilumnus, Daira, Deckenia, Domecia, Ebalia, Epilobocera, Epimelus, Erimacrus, Erimetopus, Euphylax, Favus, Gecarcinucus, Hepatella, Heterolithadia, Heteronucia, Heterozius, Hydrothelphusa, Iliacantha, Iphiculus, Iphis, Ixa, Leucosilia, Lissocarcinus, Lithadia, Lupocyclus, Merocryptus, Myrodes, Nucia, Nursia, Nursilia, Onychomorpha, Oreophorus, Osachila, Parasyclois, Parathelphusa, Parathranites, Parilia, Pariphiculus, Persephona, Phlyxia, Pirimela, Platymera, Podophthalmus, Polybius, Portumnus, Potamocarcinus, Potamonautes, Pseudophilyra, Pseudothelphusa, Randalia, Scylla, Speloeophorus, Sphaerocarcinus, Telmessus, Thalamita, Thalamitoides, Thalamonyx, Tlos, Trachycarcinus, Trichodactylus, Trichopeltarion, Valdivia.* ACARINA: *Amblyomma, Argas, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, Ixodes, Rhipicentor, Rhipicephalus.*

74. *Lista de Nomina Conservanda de Apstein*, 1915. - A Commissão não tem poderes para adoptar em bloco a lista proposta de Nomina Conservanda de Apstein, mas está prompta a considerar separadamente nomes que lhe forem apresentados com provas razoavelmente completas.

75. *Vinte e sete nomes genericos de Protozoarios, Vermes, Peixes, Repteis e Mammiferos incluidos na Lista Official de Nomes Zoologicos.* - Os vinte e sete nomes genericos seguintes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Zoologicos, com as especies typo dadas no corpo desta Opinião: PROTOZOA: *Volvox.* VERMES: *Hirudo, Lumbricus.* PISCES: *Ammodytes, Anarhichas, Atherina, Fistularia, Mugil, Myxine, Trachinus, Uranoscopus, Xiphias.* REPTILIA: *Draco.* MAMMALIA: *Balaena, Bos, Castor, Delphinus, Erinaceus, Hippopotamus, Hystrix, Monodon, Moschus, Ovis, Phoca, Sus, Talpa, Ursus.*

76. *Situação de* PYROSOMA vs. MONOPHORA; CYCLOSALPA vs. HOLOTHURIA; SALPA vs. DAGYSA; DOLIOLUM, APPENDICULARIA e FRITILLARIA. - O Secretario está auctorizado e aconselhado a insistir sobre o seguinte:- casos apresentados em busca de opinião devem ser acompanhados de dados razoavelmente completos que permittam uma consideração justa dos pontos em jogo. *Pyrosoma* 1804 tem prioridade sobre *Monophora* 1804. *Cyclosalpa* 1827 não é invalidado por *Holothuria* 1758 (typo *physalis*), que, todavia, invalida *Physalia* 1801. O uso actual de *Holothuria* (typo *tubulosa*) em relação a echinodermas não está de accordo com as Regras, mas é aconselhavel que os auctores usem *Physalia* 1801 para o siphonophoro portuguès e *Holothuria* 1791 como genero do "pepino marinho" ("sea cucumber"), até que se resolvam possivelmente suspender as Regras nestes dois casos. Como a apresentação dos casos de *Salpa, Appendicularia, Doliolum* e *Fritillaria* é incompleta e contém erros, estes casos ficam



lançados na lista indefinidamente, mas sem juizo formado; as Regras devem ser impostas nestes casos, a menos que fique demonstrado que de sua applicação resulta maior confusão do que uniformidade [Cf. Opiniões 77 e 80].

77. *Trinta e cinco nomes genericos de Protozoarios, Celenterados, Trematodeos, Cestoideos, Cirripedios, Tunicados e Peixes, collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: PROTOZOA: *Arcella.* COELENTERATA:: *Hydra.* TREMATODA: *Hemiurus, Schistosoma.* CESTODA: *Anoplocephala, Hymenolepis, Moniezia, Stilesia, Thysanosoma.* CIRRIPEDIA: *Lepas.* TUNICATA: *Pyrosoma.* PISCES: *Acipenser, Callionymus, Chimaera, Clupea, Coryphaena, Cottus, Cyclopterus, Cyprinus, Diodon, Gadus, Gasterosteus, Gobius, Lophius, Mormyrus, Mullus, Muraena, Osmerus, Perca, Salmo, Scomber, Scorpaena, Silurus, Syngnathus, Zeus.*

78. *Caso de* DERMACENTOR ANDERSONI VS. DERMACENTOR VENUSTUS. - Diante dos argumentos apresentados, a Commissão é de opinião que *Dermacentor venustus* procede de Marx *in* Neumann, 1897, exemplar typo - No. 122 da Collecção Marx (Museu Nacional dos Estados Unidos) colhido de *Ovis aries*, Texas, e que *Dermacentor andersoni* provém de Stiles, 1908, holotypo No. 9467 U. S. P. H. & M. H. S. (Serviço da Saude Publica e do Hospital de Marinha dos Estados Unidos), oriundo de Woodman, Montana.

79. *Caso do "Système des Animaux sans Vertèbres" de Lamarck,* 1801*a.* - "Considerando-se com severidade", o "Système des Animaux sans Vertèbres" de Lamarck, 1801a, não deve ser acceito como designação de especies typo.

80. *Suspensão das Regras no caso de* HOLOTHURIA *e* PHYSALIA. - Ficam por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos o genero de Echinodermas *Holothuria* Linn., 1767, restr. Bruguière, 1791, typo *H. tremula* 1767= *H. tubulosa* 1790, e o genero de Siphonophoros *Physalia* Lamarck 1801, typo *P. pelagica* 1801= *Holothuria physalis* 1758.

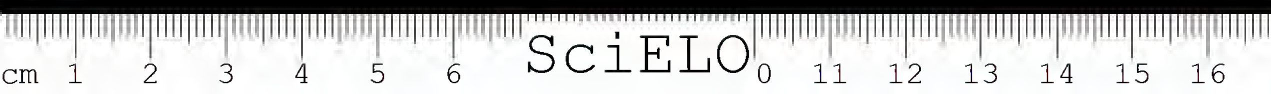
81. *Genotypo de* CIMEX, ACANTHIA, CLINOCORIS *e* KLINOPHILOS. - Diante dos argumentos apresentados á Commissão, o percevéjo commum da Europa, *Cimex lectularius*, é o genotypo de *Cimex* 1758, *Acanthia* 1775, *Clinocoris* 1829 e *Klinophilos* 1899 (*Clinophilus* 1903) e a sua designação technica apropriada sob as Regras é *Cimex lectularius*. *Cimex* Linn., 1758, typo *C. lectularius*, é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

82. *Suspensão das Regras para* MUSCA *Linneu,* 1758*a, typo* M. DOMESTICA. - Por força dos poderes conferidos á Commissão pelo 9.º Congresso Internacional de Zoologia para suspender as Regras em qualquer caso determinado, quando, a juizo seu, da applicação restricta das Regras resulte claramente maior confusão do que uniformidade, o Artigo 30 fica aqui suspenso em relação a *Musca* Linneu, 1758; e *Musca domestica* Linneu, 1758, passa a ser designado como typo de *Musca*, sem opinião preformada em relação a outros casos.

83. ACANTHIZA PYRRHOPYGIA *Vigors e Horsfield*, 1827, VS. ACANTHIZA PYRRHOPYGIA *Gould*, 1848. - A Regra de Homonymos tem por principio que qualquer nome identico, regularmente publicado, de data posterior é "nati-morto e não pode ser revivido". *Acanthiza pyrrhopygia* Vigors e Horsfield, 1827, invalida *Acanthiza pyrrhopygia* Gould, 1848.

84. *Nomes de Trematodeos, Cestoideos e Acantocephalos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: TREMATODA: *Dicrocoelium, Fasciola, Gastrodiscus, Heterophyes.* CESTODA: *Dawainea, Dipylidium, Echinococcus, Taenia.* ACANTHOCEPHALA: *Gigantorhynchus.*

28



85. *Noventa e oito nomes genericos de Crustaceos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: CRUSTACEA: *Acmaeopleura, Asthenognathus, Bathyplax, Camptandrium, Camptoplax, Catoptrus, Ceratoplax, Chasmagnathus, Chasmocarcinus, Clistocoeloma, Cyrtograpsus, Dissodactylus, Durckheimia, Epixanthus, Euchirograpsus, Eucrate, Eucratodes, Eucratopsis, Euryetisus, Euryplax, Eurytium, Fabia, Galene, Geryon, Glyptograpsus, Glyptoplax, Gomeza, Goneplax, Halimede, Helice, Hephthopelta, Hexapus, Holometopus, Holothuriophilus, Homalaspis, Lachnopodus, Leptodius, Liagore, Libystes, Liomera, Lipaesthesius, Litocheira, Lophopanopeus, Lophopilumnus, Lybia, Melybia, Metasesarma, Metopocarcinus, Micropanope, Notonyx, Oediplax, Ommatocarcinus, Opisthopus, Orphnoxanthus, Panoplax, Paragalene, Parapanope, Parapleirophrycoides, Paraxanthus, Percnon, Perigrapsus, Pilumnoides, Pilumnus, Pinnaxodes, Pinnixa, Pinnotherelia, Pinnotheres, Planes, Platychirograpsus, Platypilumnus, Platyxanthus, Polydectus, Prionoplax, Pseudocarcinus, Pseudopinnixa, Pseudorhombila, Psopheticus, Ptychognathus, Pyxidognathus, Rhithropanopeus, Rhizopa, Ruppellioides, Sarmatium, Scalopidia, Scleroplax, Speocarcinus, Sphaerozius, Tetraxanthus, Tetrias, Thaumastoplax, Utica, Varuna, Xanthasia, Xanthodius, Xenophthalmodes, Xenophthalmus, Zosimus, Zosymodes.*

86. Conulinus *von Martens*, 1895. - O nome generico *Conulinus* von Martens, 1895, toma como typo *Buliminus* (*Conulinus*) *conulus* Rv., e não é necessariamente invalidado pelo nome *Conulina* Bronn.

87. *Situação de paginas de prova em nomenclatura.* - Paginas de prova de impressor não constituem publicação e, portanto, não têm valor debaixo das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica.

88. Otarion diffractum vs. Cyphaspis burmeisteri. - O nome de uma especie não se desqualifica, simplesmente porque o auctor incluiu em sua concepção partes de corpo de mais de uma especie. O nome de um genero baseado em tal especie é, portanto, aproveitavel. *Otarion diffractum* Zenker é valido. *Atarion* deve ser preferido a *Cyphaspis*; e *C. burmeisteri* Barr. é synonymo de *O. diffractum.*

89. *Suspensão das Regras no caso de Gronow* 1763, *Commerson* 1803, *Gesellschaft Schauplatz* 1775 a 1781, *Catesby* 1771, *Browne* 1789, *Valmont de Bomare* 1768 a 1775. - Em virtude de suspensão das regras em qualquer caso em que tal suspensão possa ser considerada necessaria de accordo com a interpretação adoptada, agora e mais tarde, pela Commissão, declaram-se os seguintes trabalhos ou publicações eliminados de consideração no que concerne aos seus nomes systematicos e segundo as respectivas datas: Gronow 1763, Commerson 1803, Gesellschaft Schauplatz 1775 a 1781, Catesby 1771, Browne 1789, Valmont de Bomare 1768 a 1775.

90. *Relatorio sobre dezeseis nomes genericos de Mammiferos para os quaes se solicitou suspensão das Regras.* - Nenhum dos dezeseis nomes recebeu voto unanime para suspensão: por consequencia, a Commissão não tem poderes para suspender as Regras em relação a elles. Seis nomes (a saber *Cercopithecus, Gazella, Hippotragus, Lagidium, Nycteris e Manatus*) receberam a maioria de dois terços ou mais para suspensão e, pois, devem ser levados á decisão final de um comitê especial de tres membros, a ser nomeado pelo Presidente da secção de nomenclatura do proximo Congresso Internacional. Dez nomes (a saber: *Echidna, Anthropopithecus, Coelogenys, Chiromys, Dasypus, Dicotyles, Galeopithecus, Hapale, Rhytina* e *Simia*) deixaram de receber na votação a maioria de dois terços para a suspensão e, pois, a Lei de Prioridade não se applica em taes casos. (*)

(*) NOTA DO TRADUCTOR: Veja-se a respeito a recente monographia publicada pelo Secretario da Commissão Internacional de Nomenclatura Zoologica, Dr. Ch. Wardell Stiles com a collaboração de M. B. Orleman *in* Hygienic Laboratory Bulletin No. 145 (U. S. Public Health Service).

91. *Trinta e cinco nomes genericos de Mammiferos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este modo collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Alces, Arvicola, Ateles, Bison, Bradypus, Canis, Capra, Cebus, Cervus, Choloepus, Condylura, Cricetus, Crocidura, Cystophora, Dasyprocta, Didelphis, Erethizon, Felis, Gulo, Halichoerus, Lepus, Lynx, Mus, Myrmecophaga, Nasua, Ovibos, Phyllostomus, Procyon, Putorius, Rangifer, Rhinolophus, Rupicapra, Sciurus, Sorex, Vespertilio.*

92. *Dezeseis nomes genericos de Peixes, Amphibios e Repteis collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: PISCES: *Blennius, Echeneis, Esox, Ophidion.* AMPHIBIA: *Cryptobranchus, Desmognathus, Siren.* REPTILIA: *Alligator, Calamaria, Chelydra, Crotalus, Dermochelys, Eremias, Lacerta, Mabuya, Phrynosoma.*

93. *Doze nomes genericos de Peixes collocados na Lista Official por força de Suspensão das Regras.* - Os seguintes 12 nomes genericos de peixes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos, de accordo com o Poder Plenario para Suspensão das Regras: *Conger* Cuv., 1817 (*Muraena conger* L.); *Coregonus* Linn., 1758 (*Salmo lavaretus* L.); *Eleotris* Bloch & Schneider, 1801 (*gyrinus* Cuv. & Val.); *Epinephelus* Bloch, 1792 (*marginalis* Bloch); *Gymnothorax* Bloch, 1795 (*reticularis* Bloch); *Malapterurus* Lacépède, 1803 (*Silurus electricus* L.); *Mustelus* Linck, 1790 (*Squalus mustelus* L. [= *Mustelus laevis*]); *Polynemus* Linn., 1758 (*paradisaeus* L.); *Sciaena* Linn., 1758 (*umbra* L.= *Cheilodipterus aquila* Lacép. segundo restr. de Cuvier, 1815); *Serranus* Cuv. (*Perca cabrilla* L.); *Stolephorus* Lacép., 1803 (*commersonianus* Lacép.); *Teuthis* Linn., 1766 (*javus* L.).

Os nomes agora correntes não devem ser abandonados a menos que haja razões indiscutiveis para sua mudança.

94. *Vinte e dois nomes de Molluscos e Tunicados collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este modo collocados na Lista Official de Nomes Genericos: MOLLUSCA: *Anodonta, Argonauta, Buccinum, Calyptraea, Columbella, Dentalium, Helix, Limax, Mactra, Mya, Mytilus, Ostrea, Physa, Sepia, Sphaerium, Succinea, Teredo.* TUNICATA: *Botryllus, Clavelina, Diazona, Distaplia, Molgula.*

95. *Dois nomes genericos de Protozoarios collocados na Lista Official de Nomes Genericos.* - Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos - PROTOZOA: *Endamoeba, Trypanosoma.*

96. *Museum Boltenianum.* - A Commissão acceita o Museum Boltenianum 1798 como sendo aproveitavel do ponto de vista nomenclatorial á luz das Regras Internacionaes.

97. *O Tentamen de Hübner,* 1806 *creou generos monotypicos?* - O Tentamen de Hübner, 1806 foi sem duvida preparado essencialmente como um manuscripto multiplice, ou como uma pagina de prova (Vide Opinião No. 87), para exame e critica por um grupo restricto de peritos, isto é, em *Lepidoptera*, e não para distribuição geral como um registo em zoologia. Por consequencia, é discutivel a conclusão de que foi publicada em 1806. Mesmo que se admitta como premissa sua publicação em 1806, é discutivel que os binomios nelle contidos se devam interpretar como nomes genericos ligados a especificos. Mesmo que se admitta que taes binomios representam combinações de nomes genericos com especificos, elles são essencialmente *nomina nuda* (tendo-se em vista a data que trazem), desde que os auctores, que não possuem informações esotericas a seu respeito, não podem interpretal-os definitivamente sem consultarem a literatura mais recente. Si publicados mais tarde com dados mais positivos, esses nomes passam a ser aproveitaveis na data de sua republicação.

98. - *Brauer e Bergenstamm.* - Interpretando-se com rigor, Brauer e Bergenstamm (1889-1894) não fixaram os typos para os nomes genericos mais antigos, excepto nos casos em que affirmam claramente que a especie mencionada é *o* typo do genero.

99. ENDAMOEBA *Leidy*, 1879 vs. ENTAMOEBA *Casagrandi e Barbagallo*, 1895. - *Entamoeba* 1895, com *blattae* como typo por designação subsequente (1912), é absolutamente synonyma de *Endamoeba* Leidy, 1879a, p.300, typo *blattae*, e invalida *Entamoeba* 1895, typo por designação subsequente (1913): *hominis=coli.*

100. *Suspensão das Regras*, SPIRIFER *e* SYRINGOTHYRIS. - Em virtude de Suspensão das Regras, *Anomia striata* Martin fica estabelecido como genotypo de *Spirifer* Sowerby, 1816, e *Syringothyris typa* Winchell (= *Spirifer carteri* Hall) fica estabelecido como genotypo de *Syringothyris* Winchell, 1863.

101. *Situação nomenclatorial de Danilewsky* - *"Contribution à l'étude de la microbiose malarique" in Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, *Vol.* 5, *paginas* 758-782. - As designações technicas latinas, usadas por Danilewsky, 1891, Annales de l'Institut Pasteur, Vol. 5 (12), pp. 758-782, não estão sujeitas a citação sob a Lei de Prioridade á luz da alludida publicação.

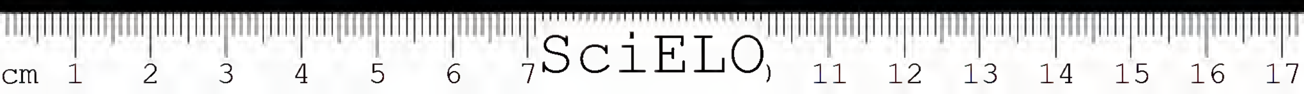
102. PROTEOCEPHALA *Blainville*, 1828, vs. PROTEOCEPHALUS *Weinland*, 1858. - Um nome generico (exemplo *Proteocephalus*, 1858) não é invalidado pela publicação anterior de um nome identico ou semelhante de collocação systematica mais elevada (exemplo *Proteocephala*, 1828). Si *Taenia ambigua* (tp. de *Proteocephalus*, 1858) é congenerico de *ocellata* (tp. de *Ichthyotaenia*, 1894), *Ichthyotaenia* é um synonymo subjectivo de *Proteocephalus.*

103. *O nome generico* GRUS, *typo* ARDEA GRUS. - O typo de *Grus* Pallas, 1767, é *Ardea grus* Linn., 1758, por tautonymia absoluta. *Grus* é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

104. *Cincoenta e sete nomes genericos collocados na Lista Official.* - Os seguintes 57 nomes genericos, com especies typo citadas, são por este modo collocados na Lista Official de Nomes Genericos: PROTOZOA: *Bursaria, Eimeria, Laverania, Plasmodium, Sarcocystis.* CESTODA: *Ligula.* NEMATODA: *Filaria, Heterodera, Rhabditis, Strongylus, Syngamus.* OLIGOCHAETA: *Enchytraeus.* HIRUDINEA: *Haemadipsa, Limnatis.* CRUSTACEA: *Armadillidium, Astacus, Cancer, Diaptomus, Gammarus, Homarus, Nephrops, Oniscus, Pandalus, Penaeus, Porcellio.* XIPHOSURA: *Limulus.* SCORPIONIDEA: *Scorpio.* ARANEAE ou ARANEIDA: *Avicularia, Dendryphantes, Dysdera, Latrodectus, Segestria.* ACARINA: *Cheyletus, Chorioptes, Demodex, Dermanyssus, Glyciphagus, Polydesmus, Psoroptes, Rhizoglyphus, Trombidium.* THYSANURA: *Lepisma.* COLLEMBOLA: *Podura.* ORTHOPTERA: *Blatta, Ectobius, Gryllus, Periplaneta.* ANOPLURA: *Pediculus, Phthirus.* HEMIPTERA: *Anthocoris, Nabis, Notonecta, Reduvius, Triatoma.* DERMAPTERA: *Forficula.* SUCTORIA s. SIPHONAPTERA s. APHANIPTERA: *Pulex.* MAMMALIA: *Cercopithecus.*

105. *Nomes de Crustaceos por Dybowski* (1926), *suppressos.* - Fica resolvido que novos nomes publicados no trabalho de Dybowski, "Synoptisches Verzeichnis mit kurzer Besprechung der Gattungen und Arten dieser Abteilung der Baikalflohkrebse" (Bul. internat. Acad. polonaise d. Sci. et d. Lettres, 1926, No. 1-2b, jan.-fev., pp.1-77), são por este meio suppressos, de accordo com Suspensão das Regras, por isso que a applicação das Regras para sua acceitação "resultará evidentemente em maior confusão do que uniformidade".

106. *O typo de* OESTRUS *Linn.*, 1758, *é* O. OVIS. - O typo de *Oestrus* Linn., 1758, é *O. ovis* (Art. 30g). A designação de *Oestrus equi* Fabr. por Latreille como typo de



Oestrus não é valido (Art. 30g). Os 5 seguintes nomes de generos de Dipteros são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Cephenemyia* (typo *trompe*), *Gastcrophilus* (typo *equi* de Clark, synonymo de *intestinalis* de Geer), *Hypoderma* (typo *bovis*), *Oedemagena* (typo *tarandi*), e *Oestrus* (typo *ovis*).

107. ECHINOCYAMUS FUSILLUS VS. ECHINOCYAMUS MINUTUS. - O caso de *Echinocyamus pusillus* vs. *Echinocyamus minutus* é objecto de duas interpretações diametralmente oppostas. Baseando-se no principio de que um nome em uso corrente não deve ser supplantado por um anterior mas raramente adoptado, ou por um nome não adoptado, a menos que o argumento seja ambiguo e que as premissas não estejam sujeitas a differenças de opinião, a Commissão, tendo em vista a situação algo incerta de *minutus*, é de Opinião que *pusillus* 1776 não deve ser suppresso por *minutus* 1774.

108. *Suspensão das Regras para* GAZELLA 1816. - De accordo com a Suspensão das Regras, *Gazella* Blainville, 1816, especie typo *Capra dorcas* Linn., 1758a, é adoptada de preferencia a *Oryx*, e por este modo é collocada na Lista Official de Nomes Genericos.

109. *Suspensão das Regras para* HIPPOTRAGUS 1846. - De accordo com a Suspensão das Regras (si for preciso), *Hippotragus* Sundevall, 1846, especie typo *Antilope leucophaca* Pallas, 1776, é adoptada de preferencia a *Egocerus* Desmarest, 1822, e a *Ozanna* Reichenbach, 1845 (não *Aegoceros* Pallas, 1811), sendo por este modo collocada na Lista Official de Nomes Genericos.

110. *Suspensão das Regras para* LAGIDIUM 1833. - De accordo com a Suspensão das Regras, *Lagidium* Meyen, 1833, especie typo *Lagidium peruanum* Meyen, é adoptado de preferencia a *Viscaccia* Oken, 1816, genotypo "*Lepus chilensis* Molina", e por este modo é collocada na Lista Official de Nomes Genericos.

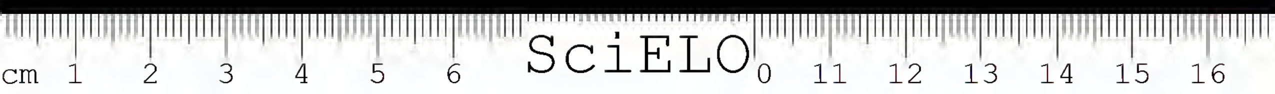
111. *Suspensão das Regras para* NYCTERIS 1795. - De accordo com a Suspensão das Regras, *Nycteris* Cuvier & Geoffroy, 1795, especie typo *Vespertilio hispidus* Schreber, 1774, é adoptado de preferencia a *Petalia* Gray, 1838, genotypo *Nycteria javanica* Geoffroy, e é por este modo collocada na Lista Official de Nomes Genericos.

112. *Não foi acccita a Suspensão para* MANATUS 1772 VS. TRICHECHUS 1758. - Não foi acceita a Suspensão das Regras para o caso de *Manatus* Brünnich, 1772, especie typo *Trichechus manatus* Linn., 1758a, localidade typo Antilhas, versus *Trichechus* Linn., 1758a, monotypo *T. manatus*; por consequencia, o nome *Trichechus* é applicado ao peixe-boi em vez de á morsa. *Trichechus* Linn., 1758a, typo *T. manatus*, é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

113. SARCOPTES *Latreille*, 1802, *typo* SCABIEI, *collocado na Lista Official*. - *Sarcoptes* Latreille data de 1802, em vez de 1804 ou 1806, como é frequentemente citado. Foi originalmente monotypico, contendo somente *Acarus scabiei*. A designação, feita em 1810, do typo de *Acarus passerinus* é invalida de accordo com o Artigo 30c e 30e *a*. A acceitação de *Acarus scabiei* como especie typo de *Acarus* é invalidada pelo Artigo 30g, donde *Acarus siro* (syn. *farinae*) é o typo de *Acarus*. *Sarcoptes* Latr., 1802, typo *scabiei* é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

114. *De accordo com a Suspensão*, SIMIA, SIMIA SATYRUS *e* PITHECUS *são suppressos*. - De accordo com a Suspensão das Regras os nomes *Simia*, *Simia satyrus*, e *Pithecus* são por este modo suppressos, baseando-se em que sua retenção, de accordo com as Regras, produzirá maior confusão do que uniformidade.


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

Typographia Levi
SÃO PAULO

